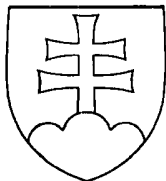


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 05.08.94
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/196 025, 08/203 197,
08/215 203, 08/252 491
- (32) Dátum priority: 14.02.94, 25.02.94,
21.03.94, 01.06.94
- (33) Krajina priority: US, US, US, US
- (40) Dátum zverejnenia: 08.10.97
- (86) Číslo PCT: PCT/US94/08806, 05.08.94

(21) Číslo dokumentu:

1008-96

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12N 15/19,
C 07K 14/52,
C 07K 16/24,
C 12N 1/21,
C 12N 5/10,
C 12N 1/19,
A 01K 67/027,
A 61K 38/19,
C 12Q 1/68,
C 12N 15/11

(71) Prihlasovateľ: ZymoGenetics, Inc., Seattle, WA, US;
University of Washington, Seattle, WA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Holly Richard D., Seattle, WA, US;
Lok Si, Seattle, WA, US;
Foster Donald C., Seattle, WA, US;
Hagen Frederick S., Seattle, WA, US;
Kaushansky Kenneth, Woodinville, WA, US;
Kuijper Joseph L., Bothell, WA, US;
Lofton-Day Catherine E., Brier, WA, US;
Oort Pieter J., Seattle, WA, US;
Burkhead Steven K., Seattle, WA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Hematopoetická bielkovina, materiály a spôsoby ich prípravy**

(57) Anotácia:

Sú opísané myšie a ľudské hematopoetické bielkoviny alebo ich polypeptidové fragmenty, ako cytokinínová doména, ktoré stimulujú proliferáciu a diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekursorov. Ide najmä o rekombinantný trombopoietín (TPO), bielkovinu, ktorá stimuluje tvorbu krvných doštičiek z prekursorových buniek kostnej drene. Sú opísané aj polynukleotidové molekuly kódujúce tieto bielkoviny, ako i vektory (napríklad plazmidy) a hostiteľské bunky (napríklad kvasinkové) vhodné na expresiu a izoláciu hematopoetických bielkovín. Je opísané aj transgénne zviera, napríklad myš alebo ovca, do zárodočnej línie ktorého bol zavedený úsek heterológnej DNA kódujúcej TPO, pričom toto zviera produkuje príslušnú bielkovinu. Sú tu uvádzané aj monoklonálne protilátky, ktoré sa viažu na epitop bielkovín podľa vynálezu a ktoré napríklad umožňujú afinitné čistenie týchto bielkovín. Je opísaný tiež spôsob detekcie DNA kódujúcej trombopoietín v zmesi DNA molekúl, ktorý zahŕňa hybridizačné sondovanie tejto zmesi oligonukleotidovou sondou, ktorá svojou sekvenciou zodpovedá časti DNA špecifickej pre trombopoietín. Bielkoviny a polypeptidy sú vhodné najmä na terapiu in vivo a ex vivo, napríklad na stimuláciu tvorby krvných doštičiek onkologických pacientov po chemoterapii alebo radiačnej terapii. Sú preto uvedené aj farmaceutické prostriedky, ktorých účinnou zložkou je rekombinantný trombopoietín. Bielkoviny a ďalšie materiály sú vhodné tiež na výskum diferenciácie a proliferácie v systéme krvných buniek.

Hematopoetická bielkovina, materiály a spôsoby ich prípravy

Oblasť techniky

Riešenie sa týka hematopoetickej bielkoviny a materiálov, ako aj spôsobu ich prípravy.

Táto prihláška je časťou pokračovania prihlášky č. 08/215 203 podanej 21. marca 1984, ktorej časť je pokračovaním prihlášky č. 08/203 197 podanej 25. februára 1984 a ktorej časť je pokračovaním prihlášky 08/196 025 podanej 14. februára 1984, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz.

Doterajší stav techniky

Hematopoézia je proces, v ktorom sa krvné bunky vyvíjajú a diferencujú z pluripotentných kmeňových buniek v kostnej dreni. Tento proces zahŕňa komplexné prepojenie akcie polypeptidových rastových faktorov (cytokinínov), pôsobiacich prostredníctvom membránovo viazaných receptorov na ciele bunky. Pôsobenie cytokinínov spôsobuje proliferáciu a diferenciáciu buniek, pričom odpoveď na konkrétny cytokinín je často špecifická pre určitú líniu alebo štádium. Vývoj jedného typu buniek, ako sú doštičky z kmeňových buniek, môže vyžadovať koordinované pôsobenie viacerých cytokinínov pôsobiacich v správnom poradí.

Známe cytokiníny zahŕňujú interleukíny, akými sú IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 a i., a faktory stimulujúce kolónie, akými sú G-CSF, N-CSF, GM-CSF, erythropoietin (EPO) a i. Interleukíny všeobecne pôsobia ako mediátory imunitnej a zápalovej odpovede. Kolónie stimulujúce faktory stimulujú proliferáciu buniek odvodených z drene, aktivujú zrelé leukocyty a tvoria inak integrálnu súčasť hostiteľskej odpovede na zápalové, infekčné a imunologické podnety.

Rôzne cytokiníny boli vyvinuté ako terapeutické činidlá. Napríklad erythropoietin, ktorý stimuluje vývoj erytrocytov, sa používa na liečbu anémie, vznikajúcej ako dôsledok zlyhania ľadvín. Niekoľko faktorov stimulujúcich kolónie sa používa v spojení s nádorovou liečbou na urýchlenie obnovy imunitného systému pacienta. Interleukin-2, α -interferon a γ -interferon sa používajú pri liečbe určitých nádorov. Aktivita stimulujúca megakaryocytopoéziu a trombocytopoéziu bola zistená v telesných tekutinách trombocytopenických zvierat a v literatúre sa na ňu odkazuje ako na "trombopoietin" (recentné prehľady McDonald, *Exp. Hematol.* 16, 201-205, 1988 a McDonald, *Am. J. Ped. Hematol. Oncol.* 14, 8-21, 1992). Napriek viac ako trom desiatkam výskumov nie je táto aktivita definitívne charakterizovaná, sčasti pre nedostatok dobrého zdroja a chýbajúcu dobrú analytickú metódu, a pre chýbajúce vedomosti ohľadom miest tvorby.

Mierne poruchy krvácania (mild bleeding disorders, MBDs) spojené s dysfunkciou doštičiek sú relatívne bežné (Bachmann, *Seminars in Hematology* 17, 292-305, 1980), ako je určitý počet vrodených porúch funkcie doštičiek, vrátane Barnardovho-Soulie - rovho syndrómu (nedostatočnosť v doštičkách GPIIb a GPIIIa), vrodenej afibrinogenémie (zníženej alebo chýbajúcej hladiny fibrinogénu v plazme a v doštičkách), a sivého doštičkového syndrómu (absencia α -granúl). Navyše existuje určitý počet porúch spojených so sekréciou doštičiek, nedostatočnou uloženou zásobou, abnormalitami dráhy kyseliny arachidónovej v doštičkách, nedostatkom cyklooxygenázy a tromboxynsyntetázy v doštičkách a s defektami v aktivácii doštičiek (prehľad : Rao a Holmsen, *Seminars in Hematology* 23, 102-118, 1986). V súčasnosti molekulárny základ týchto porúch nie je ešte správne pochopený.

Izolácia a charakterizácia bielkovín doštičiek môže poskytnúť neoceniteľné prostriedky na objasnenie defektov, ktoré sú príčinou viacerých dysfunkcií doštičiek. Hlavný obmedzujúci krok podrobnej molekulárnej analýzy spočíva v ťažkostiach so získavaním mRNA z doštičiek alebo ich prekursorov, megakaryocytov, na analýzu a na konštrukciu cDNA knižnice.

Doštičkám chýba jadro a transkripcia. Stopové množstvá mRNA, ešte spojených s doštičkami, je možné ťažko izolovať a často podliehajú degradácii. Konštrukcia cDNA knižníc doštičiek takto vyžadovala veľké množstvá doštičiek, typicky od 25 až 250 jednotiek celej krvi (Izumi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7477-7481, 1990; Wicky et al., *Thrombosis and Hemostasis* 61, 448-453, 1989; a Wenger et al., *Blood* 73, 1498-1503, 1989), alebo z ferézy pacientov so zvýšenými množstvami krvných doštičiek v dôsledku esenciálnej trombocytémie (Roth et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160, 705-710, 1989). Tam, kde boli izolované cDNA špecifické pre doštičky, boli mRNA pravdepodobne najstabilnejšie alebo najvhodnejšie zo všetkých druhov mRNA a predstavovali pravdepodobne len malý zlomok z celkového kódovacieho repertoáru doštičiek.

Alternatívnou cestou k cDNA knižnici doštičiek je izolácia a konštrukcia knižnice z mRNA izolovanej z megakaryocytov, priamych bunčných prekursorov doštičiek. Megakaryocyty sú polyploidné bunky a predpokladá sa, že budú obsahovať mRNA kódujúce bielkoviny doštičiek a megakaryocytov v celom rozsahu. Ukázalo sa však ťažké izolovať megakaryocyty v dostatočnom počte a čistote.

Súčasný pokrok v molekulárnej biológii značne zlepšili chápanie hematopoézie, ale súčasne ukázali, že tento proces je veľmi zložitý. Aj keď mnohé cytokiníny boli charakterizované a u niektorých bolo preukázané, že majú klinickú využiteľnosť, stále však v danom odbore sú potrebné ďalšie činidlá, ktoré by stimulovali proliferáciu a diferenciáciu myeloidných a lymfoidných prekursorov a tvorbu zrelých krvných buniek. Zvlášť sú potrebné činidlá, ktoré stimulujú vývoj a proliferáciu buniek megakaryocytickej línie, vrátane doštičiek. Potrebné sú tiež činidlá, ktoré by mohli byť použité na liečbu cytopénie, vrátane trombocytopénie, stavu s abnormálne nízkym množstvom doštičiek v krvnom obeh (menej ako asi 1×10^5 doštičiek/mm³) a iných porúch doštičiek. Predkladaný vynález rieši tieto potreby a uvádza ďalšie výhody.

Podstata vynálezu

Predmetom tohto vynálezu sú bielkoviny majúce hematopoetickú aktivitu.

Ďalším predmetom vynálezu je spôsob výroby bielkovín majúcich hematopoetickú aktivitu, ako i izolovaných molekúl DNA, vektorov a buniek, použiteľných v rámci tohto spôsobu.

Ďalším predmetom vynálezu sú protilátky, ktoré sa viažu na epitopy na hematopoetickej bielkovine.

Ďalším predmetom vynálezu je spôsob stimulácie produkcie megakaryocytov, doštičiek a neutrofilov u cicavcov, vrátane človeka.

Ďalším predmetom vynálezu je rad nástrojov na použitie v štádiu vývoja, diferenciácie a proliferácie buniek kostnej drene a na detekciu chorôb charakterizovaných abnormalitami vo vývoji, diferenciácii a proliferácii buniek kostnej drene.

Vynález poskytuje izolovanú bielkovinu, vybratú zo skupiny pozostávajúcej z a) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196; b) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 206; c) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173; d) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 175; e) alelických variantov a), b), c) a d); a f) druhových homológov a), b), c), d) a e), pričom bielkovina stimuluje proliferáciu a diferenciáciu myleoidných alebo lymfoidných prekurzorov. V určitých uskutočneniach bielkovina zahrňuje sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 379 alebo sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 353.

Vynález poskytuje tiež izolovanú polynukleotidovú molekulu kódujúcu bielkovinu, ako je to uvedené vyššie. V jednom uskutočnení je polynukleotidovou molekulou molekula DNA obsahujúca kódujúce vlákno so sekvenciou nukleotidov vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692 alebo sekvenciu nukleotidov vzorca IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519. V iných uskutočneniach táto molekula obsahuje nukleotidy 237-1241, 174-1241, 105-722, 174-722 alebo 237-722 zo vzorca III alebo odpovedajúce oblasti zo vzorca IV. Vynález ďalej poskytuje alelické varianty týchto molekúl a DNA molekuly kódujúce hematopoetickú bielkovinu, molekuly ktorých kódujú bielkovinu, ktorá je aspoň na 80 % identická vo svojej aminokyselinovej sekvencii s bielkovinou kódovanou jednou z uvedených častí vzorca III alebo vzorca IV. Sú poskytnuté i komplementárne molekuly k týmto sekvenciám.

Vynález poskytuje aj izolovanú DNA molekulu, vybratú zo skupiny pozostávajúcej z a) EcoRI-XhoI inzertu plazmidu pZGmp1-1081 (ATCC 69566), b) alelickej varianty a), a c) DNA molekulu kódujúcu bielkovinu, ktorá je aspoň na 80 % identická vo svojej aminokyselinovej sekvencii s bielkovinou kódovanou a) alebo b), pričom izolovaná DNA molekula kóduje bielkovinu, ktorá má hematopoetickú aktivitu.

Vynález poskytuje ďalej vektor expresie obsahujúci nasledujúce funkčne spojené prvky: promotor transkripcie; úsek DNA vybratý zo skupiny zahrňujúcej a) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692; b) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519; c) alelické varianty a) alebo b) a d) DNA úseky kódujúce hematopoetickú bielkovinu, ktorá je aspoň na 80 % identická vo svojej aminokyselinovej sekvencii s bielkovinou kódovanou a), b) alebo c); a terminátor transkripcie.

Vynález tiež poskytuje kultivované bunky, do ktorých bol zavedený vektor expresie, ako je uvedené vyššie, pričom bunky

exprimujú hematopoetickú bielkovinu, kódovanú segmentom DNA. V určitých uskutočneniach je bunkou bunka huby, bunka cicavčia alebo bakteriálna bunka.

Vynález sa týka ďalej cicavca (iného ako človeka), do zárodočnej línie ktorého bol zavedený úsek heterológnej DNA, ktorý kóduje hematopoetickú bielkovinu, ako sa to uvádza vyššie, pričom cicavec produkuje hematopoetickú bielkovinu kódovanú spomínaným úsekom DNA.

Vynález poskytuje aj spôsob stimulácie produkcie doštičiek u cicavca. Spôsob zahŕňa podávanie terapeuticky účinného množstva hematopoetickej bielkoviny vybratej zo skupiny pozostávajúcej z a) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196; b) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173; c) alelických variantov a) a b); a d) druhových homológov a), b) alebo c), pričom bielkovina stimuluje proliferáciu a diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekurzorov v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom.

Tieto a ďalšie aspekty vynálezu budú objasnené s odkazmi na nasledujúci podrobný opis a priložené obrázky.

Prehľad obrázkov na výkrese

Obr. 1 znázorňuje čiastočnú restriktívnu mapu vektora pDX. Použitými symbolmi sú: SV40 ori, začiatok replikácie z SV40; SV40 E, zosilňovač SV40; adenovírusový hlavný neskorý promotor; L1-3, adenovírusová trojitá zavádzacia sekvencia; ss, signály zostrihu; pA miesto polyadenylácie.

Obr. 2 ilustruje konštrukciu plazmidu pBJ3. Použitými symbolmi sú: TPIp, promótor TPI1; TPIt, terminátor TPI1; AAT, α -1 antitrypsín cDNA; α^- zavádzacia sekvencia α -faktora; mTPO, myšie TPO kódujúce sekvencie.

Podrobný opis vynálezu

Pred podrobným opisom tohto vynálezu je vhodné definovať určité pojmy tu používané.

Alelický variant: Alternatívna forma génov, ktorá vzniká v dôsledku mutácie alebo pozmenený polypeptid kódovaný mutovaným génom. Mutácia v géne môže byť skrytá (bez zmeny v kódovanom polypeptide) alebo môže kódovať polypeptidy s pozmenenou aminokyselinovou sekvenciou.

cDNA: Komplementárna DNA, pripravovaná reverznou transkripciou templátu messenger RNA alebo klon či amplifikovaná kópia takejto molekuly. Komplementárna DNA môže byť jednovláknová alebo dvojvláknová.

Vektor expresie: Molekula DNA, lineárna alebo kruhová, ktorá obsahuje úsek kódujúci bielkovinu, ktorá je predmetom záujmu, vo funkčnom spojení s ďalšími úsekmi, ktoré zabezpečujú jej transkripciu. Takéto ďalšie úseky zahrňujú promotorové a terminátorové sekvencie a môžu tiež zahrňovať jeden alebo viac začiatkov replikácie, jeden alebo viac selekčných markerov, enhancer, polyadenylačný signál atď. Vektory expresie sa obecné odvodzujú z plazmidovej alebo vírovej DNA a môžu obsahovať úseky z obidvoch. Výraz "funkčné spojenie" znamená, že úseky sú usporiadané tak, že fungujú spoločne pre myslený účel, napr. že transkripcia začína v promótore a pokračuje cez kódujúcu sekvenciu k terminátoru.

Gén: Úsek chromozomálnej DNA, ktorý kóduje polypeptidový reťazec. Gén obsahuje jednu alebo viac oblastí kódujúcich aminokyseliny, ktoré sú v niektorých prípadoch preložené nekódujúcimi "intervenčnými sekvenciami" ("intrónmi) spolu s obklopujúcimi nekódujúcimi oblasťami, ktoré zabezpečujú transkripciu kódujúcu sekvencie.

Molekuly komplementárne k: Polynukleotidové molekuly s komplementárnou postupnosťou báz a opačnou orientáciou v

porovnaní s kontrolnou sekvenciou. Napríklad : Sekvencia 5' ATGCACGGG 3' je komplementárna k 5' CCCGTCCAT 3'.

Promótor: Časť génu, ku ktorému sa viaže polymeráza a kde je iniciovaná syntéza mRNA.

Ako je vyššie uvedené, tento vynález poskytuje materiály a spôsoby na použitie pri produkcii bielkovín, ktoré majú hematopoetickú aktivitu. Tu používaný výraz "hematopoetický" znamená schopnosť stimulovať proliferáciu alebo diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekursorov, ktorá sa stanovuje štandardnými testami. Viď napríklad Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5327-5330, 1980; a Metcalf et al., *Exp. Hematol.* 15, 288-295, 1987. Typicky sa bunky drene inkubujú v prítomnosti testovanej a kontrolnej vzorky. Kultúry sa potom vyhodnocujú na proliferáciu a diferenciáciu buniek pomocou vizuálneho prehliadania alebo farbenia. Veľmi výhodným testom je kolorimetrické stanovenie s MTT podľa Mosman (*J. Immunol. Meth.* 65, 55-63, 1983; tu zahrnuté ako odkaz), ktoré bude opísané podrobnejšie v príkladoch, ktoré nasledujú.

Tento vynález je sčasti založený na zistení aktivity, ktorá stimuluje rast buniek prostredníctvom MPL receptora. Tento receptor (Souyri et al., *Cell* 63, 1137-1147, 1990) bol pred týmto zistením receptor "sirôtka", ktorého prirodzený ligand nebol známy. V priebehu klonovania a mutagenézy, ktoré sú podrobne opísané v príkladoch, ktoré nasledujú, vynálezci vyvinuli bunečnú líniu, ktorá je závislá na prežití a rastu od stimulácie dráhy spojennej s MPL receptorom a schopnú autokrinnej stimulácie tohto receptora. V kondicionovaných médiách týchto na interleukín-3 (IL-3) nezávislých buniek sa zistilo, že podporujú rast buniek exprimujúcich MPL receptor a inak závislých na IL-3. Pokusy s protilátkovou neutralizáciou ukázali, že táto aktivita nebola spojená s IL-3 alebo IL-4 a že mohla byť neutralizovaná rozpustnou formou MPL receptora. Potom bola z IL-3 nezávislej bunečnej línie pripravená cDNA knižnica. DNA bola použitá na transfekciu ľadvinových buniek škrekčkov (baby hamster kidney, BHK) a médiá transfektantov boli testované na schopnosť

stimulovať proliferáciu buniek závislú od MPL. Bol izolovaný pozitívny klon a pripravený bol rekombinantný MPL ligand. V rekombinantnej bielkovine bolo zistené, že stimuluje proliferáciu v širokom spektre myeloidných a lymfoidných prekurzorov a najmä že stimuluje produkciu megakaryocytov a neutrofilov z progenitórnych buniek v kostnej dreni. Navyše bolo zistené, že rekombinantná bielkovina stimuluje produkciu doštičiek u pokusných zvierat. S ohľadom na túto aktivitu bola táto bielkovina nazvaná trombopoietin (TPO).

Tento vynález poskytuje izolované polynukleotidové molekuly kódujúce trombopoietin. Takéto polynukleotidové molekuly zahŕňujú mRNA, genómovú DNA, cDNA, syntetickú DNA a DNA molekuly generované spojením fragmentov DNA z rôznych zdrojov. Na produkciu rekombinantného TPO sú vo väčšine systémov exprese výhodné DNA molekuly bez intrónov. "Izolované" je chápané tak, že molekuly sú vyňaté zo svojho prirodzeného prostredia. Vynález teda poskytuje DNA molekuly bez iných génov, s ktorými sú normálne spojené. Molekuly sú najmä bez nadbytočných a nežiadúcich sekvencií a sú vo forme vhodnej na použitie v geneticko-inžinierskom systéme produkcie bielkoviny.

Sekvence cDNA klonov kódujúcich reprezentívne myšie, resp. ľudské TPO bielkoviny, sú zahrnuté vo vzorci III a IV a odpovedajúce aminokyselinové sekvencie sú zahrnuté vo vzorci I a II. Tí, čo sú zruční v odbore zistia, že sekvencie vo vzorcoch I, II, III a IV a genomické sekvencie vo vzorcoch V a VII odpovedajú jednotlivým alelám myšieho alebo ľudského génu a že je očakávaná existencia alelických variácií. Alelické variácie DNA sekvencií zahrnutých vo vzorci II, IV a V, vrátane tých, čo obsahujú mlčiace mutácie a tých, ktorých mutácie vedú k zámenám aminokyselín, sú v rozsahu tohto vynálezu, akými sú aj bielkoviny, ktoré sú alelickými variáciami vzorca I a II. Je tiež zrejmé, že ten, ktorý je zručný v odbore, môže "inžinierovať" miesta, ktoré pomôžu manipulovať nukleotidové sekvencie s použitím alternatívnych kodónov.

Myšie a ľudské sekvencie tu zverejnené sú vhodnými

nástrojmi na prípravu izolovaných polynukleotidových molekúl kódujúcich TPO bielkoviny z iných druhov ("druhové homológy"), akými sú bovinné, psie, prasacie, ovčie, konské a najmä bielkoviny primátov. Metódy na využitie sekvenčnej informácie z jedného druhu na klonovanie odpovedajúcej polynukleotidovej sekvencie z druhého druhu sú v odbore dobre známe. Viď napríklad Ausubel et al., vyd., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. Molekuly DNA podľa vynálezu kódujúce TPO sú vo svojej sekvencii všeobecne aspoň na 60 %, výhodne aspoň na 80 % a môžu byť na 90 až 95 % identické so vzorcom III a vzorcom IV a ich alelickými variantmi. Trombopoietinové molekuly sú charakteristické svojou schopnosťou viazať sa na MPL receptor toho istého druhu a stimulovať produkciu doštičiek *in vivo*. V normálnych pokusných zvieratách je TPO schopný zvýšiť hladinu doštičiek o 100 % alebo viac počas 10 dní od začiatku denného podávania.

Analýza distribúcie mRNA ukázala, že mRNA kódujúca TPO bola prítomná v niektorých tkanivách myši a človeka a bola častejšia v pľúcach, pečeni, srdci, kostrovom svalu a v ľadvinách. Na izoláciu homológov z iných druhov sa teda pripraví cDNA knižnica, s výhodou z jedného tkaniva, v ktorom bola zistená vysoká produkcia mRNA. Spôsoby prípravy cDNA knižníc sú v odbore dobre známe. Viď napríklad Sambrook et al., vyd., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 a odkazy tam citované. Na detekciu molekúl kódujúcich TPO sa potom knižnica testuje s myšiacou alebo ľudskou cDNA, tu zverejnenou, alebo s ich fragmentami alebo s jednou alebo viacerými malými sondami založenými na zverejnených sekvenciách. Užitočné sú najmä sondy obsahujúce oligonukleotid s dĺžkou aspoň 14 alebo viac nukleotidov až do 25 alebo viac nukleotidov, ktoré sú aspoň na 80 % identické s úsekom rovnakej dĺžky zo vzorca II, IV, V alebo ich komplementárnej sekvencie. Je výhodné testovať knižnicu pri nízkej hybridizačnej "stringencii", t.j. asi 2 x SSC a hybridizačnej teplote okolo 50 °C za použitia značených sond. Molekuly, s ktorými sonda hybridizuje, sú detekované použitím štandardných detekčných postupov. Pozitívne klony sa potvrdzujú

sekvenčnou analýzou a testami aktivity, ako je na schopnosť viazať homológny MPL receptor (t.j. MPL receptor z rovnakého druhu ako je cDNA) alebo na stimuláciu hematopoézy z homológnych dreňových buniek. Ako je zrejme odborníkom v danej oblasti, je možné použiť i iné klonovacie metódy.

Polynukleotidové molekuly kódujúce TPO (vrátane alelických variantov a druhových homológov molekúl tu uvádzaných) je možné izolovať tiež klonovaním z bunkovej línie, ktorá produkuje MPL ligand a vykazuje autokrinnú stimuláciu rastu. Stručne: Od faktora závislá bunková línia sa transfekuje na expresiu MPL receptora (Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5640-5644, 1992; Skoda et al., *EMBO J.* 12, 2645-2653, 1993; a vzorec VI), potom mutagenizuje a selektujú sa bunky nezávislé od faktora. Tieto bunky sa potom použijú ako zdroj TPO mRNA. Vhodné od faktora závislé bunkové línie zahrňujú IL-3-závislú bunkovú líniu BaF3 (Palacios a Steinmetz, *Cell* 41, 727-734, 1985; Methey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6, 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel et al., *Blood* 64, 786-790, 1984) a MO7e (Kisset al., *Leukemia* 7, 235-240, 1993). Bunkové línie závislé od rastového faktora môžu byť založené podľa publikovaných metód (napr. Greenberger et al., *Leukemia Res.* 8, 363-375, 1984; Dexter et al., v Baum et al., vyd., *Experimental Hematology Today*, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980). Pri typickom postupe sa bunky, o ktoré je záujem, vyberú z tkaniva (napr. kostná dreň, slezina, pečeň plodu) a kultivujú sa v konvenčnom, sérom doplnenom médiu, akým je RPMI 1640 doplneným o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS), 15 % konského séra a 10^{-6} M hydrokortizónu. V jedno až dvojtýždenných intervaloch sa odoberú neadherujúce bunky a ku kultúre sa pridá čerstvé médium. Odobraté neadherujúce bunky sa premyjú a kultivujú v médiu s pridaným zdrojom rastového faktora (napr. RPMI 1640 + 10 % FBS + 5-20 % WEHI-3 kondicionovaného média ako zdroja IL-3). Týmto bunkám sa dáva čerstvé médium v jedno- až dvojtýždňových intervaloch a expandujú sa, keď kultúra rastie. Po niekoľkých týždňoch až niekoľkých mesiacoch sú jednotlivé klony izolované nanosením buniek na polotuhé médium (napr. médium obsahujúce metylcelulózu), alebo pomocou limitujúceho

riedenia. Závislosť klonov od faktora sa potvrdzuje kultiváciou jednotlivých klonov v neprítomnosti rastového faktora. Na získanie buniek závislých od rastového faktora vo vyššom meradle je možné použiť retrovírovú infekciu alebo chemickú mutagenézu. Bunky závislé od faktora sa transfekujú na expresiu MPL receptora, potom mutagenizujú, ako napr. chemickým pôsobením, expozíciou na ultrafialovom svetle, expozíciou na röntgenovom žiarení alebo retrovírovou inzerčnou mutagenézou. Mutagenizované bunky sa potom kultivujú v podmienkach, v ktorých je prežitie buniek závislé od autokrinnej produkcie rastového faktora, teda v neprítomnosti exogenného faktora(ov) požadovaného v rodičovských bunkách. Produkcia TPO sa potvrdzuje testovaním, akým je testovanie kondicionovaných médií na bunkách exprimujúcich a neexprimujúcich MPL receptor alebo testovanie aktivity kondicionovaných médií v prítomnosti rozpustného MPL receptora a protilátok oproti známym cytokinóm.

Tento vynález tiež opisuje izolované bielkoviny, ktoré sú podstatne homológne s bielkovinami vzorca I a II a ich druhovými homológmi. "Izolovaná" je chápaná tak, že bielkovina sa nachádza v iných podmienkach ako v prirodzenom prostredí, napr. mimo krvi a tkanív zvierat. Vo výhodnej forme je izolovaná bielkovina v podstate bez iných bielkovín, najmä iných bielkovín živočíšneho pôvodu. Bielkoviny je výhodné získať vo vysoko vyčistenej forme, t.j. s čistotou vyššou ako 95 %, výhodne vyššou ako 99 %. Výraz "podstatne homológny" sa tu používa na označenie bielkovín, ktoré majú 50 %, výhodne 60 %, výhodnejšie aspoň 80 % sekvenčné homológie so sekvenciami uvedenými vo vzorci I alebo II alebo ich druhovými homológmi. Takéto bielkoviny sú výhodne aspoň na 90 % a najvýhodnejšie na 95 % identické so vzorcom I alebo II alebo ich druhovými homológmi. Percento identity sa určuje konvenčnými spôsobmi. Vid' napríklad Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48, 603-616, 1986 a Henikoff a Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915-10919, 1992. Stručne: Dve aminokyselinové sekvencie sa priložia k sebe na optimalizáciu výsledku priloženia s použitím pokuty za otvorenie medzery v hodnote 10, rozšírenie medzery v hodnote 1 a hodnotiacia matrica "blosum 62" Henikoffa a Henikoffa (ibid.),

ako je to uvedené v tabuľke 1 (aminokyseliny sú označené štandardným jednopísmenkovým kódom). Percento identity sa potom počíta ako:

Celkový počet zhôd

$$\frac{\text{(dĺžka dlhšej sekvencie + počet medzier zavedených do dlhšej sekvencie na priloženie dvoch sekvencií)}}{\text{dĺžka dlhšej sekvencie}} \times 100$$

Tabuľka 1

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

V podstate homológne bielkoviny sú charakterizované ako tie, ktoré majú jednu alebo viac aminokyselinových zámien, delécie alebo adície. Tieto zmeny sú výhodne menšieho rozsahu, ako konzervatívne zámieny aminokyselín, ktoré už výrazne neovplyvnia priestorové usporiadanie a aktivitu bielkoviny (viď tabuľku 2), krátke delécie, typicky jednej až asi 30 aminokyselín, a krátke N- a C-koncové extenzie, ako je N-koncový metionínový zvyšok, malý spojovací peptid do asi 20-25 zvyškov, alebo malá extenzia, ktorá uľahčuje čistenie, akou je polyhistidínový trakt, antigenný epitop alebo väzbová doména. Všeobecne viď Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2, 95-107, 1991, čo je tu zahrnuté ako odkaz.

Tabuľka 2

Konzervatívne zámieny aminokyselín

zásadité :	arginín
	lyzín
	histidín
kyslé :	kyselina glutamová
	kyselina asparágová
polárne :	glutamín
	asparagín
hydrofóbne :	leucín
	izoleucín
	valín
aromatické :	fenylalanín
	tryptofan
	tyrozín
malé :	glycín
	alanín
	serín
	treonín
	metionín

Aminokyseliny podstatné pre aktivitu TPO môžu byť identifikované podľa známych postupov, akým je cielená mutagenéza alebo mutagenéza "alanínovým prechádzaním" (Cunningham a Wells, *Science* 244, 1081-1085, 1989). V posledne menovanej technike sa jednotlivé alanínové mutácie zavádzajú do každého zvyšku molekuly a výsledné mutantné molekuly sa testujú na biologickú aktivitu (napr. na väzbu na receptor, *in vivo* alebo *in vitro* proliferáciu aktivitu), na identifikáciu aminokyselinových zvyškov, ktoré sú kritické pre aktivitu molekuly. Miesta interakcie ligand-receptor môžu byť tiež stanovené takými technikami, akou je nukleárna magnetická rezonancia, kryštalografia a fotoafinitné označenie. Viď napríklad de Vos et al., *Science* 255, 306-312, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224, 899-904, 1992; Wlodawer et al., *FEBS Lett.* 309, 59-64, 1992.

Všeobecne sa u cytokinínov predpokladá štruktúra štyroch α -skrutkovic, pričom prvá a štvrtá skrutkovica sú najdôležitejšie a sú konzervovanejšie medzi členmi tejto rodiny. S odkazom na aminokyselinovú sekvenciu ľudského TPO uvedenú vo vzorci II, porovnanie sekvencií cytokinínov ukazuje, že tieto skrutkovnice sú spojené aminokyselinovými zvyškami 29 a 53, 80 a 99, 108 a 130, 144 a 168 (rozhraním sú ± 4 zvyšky). Rozhranie skrutkovic myšieho (vzorec I) a ďalších TPO, iných ako ľudských, môže byť stanovené priložením na ľudskú sekvenciu. Iné dôležité štruktúrne aspekty TPO zahŕňujú cysteínové zvyšky v pozíciách 51, 73, 129 a 195 zo vzorca I (odpovedajúce pozíciám 28, 50, 106 a 172 zo vzorca II).

Bielkoviny podľa vynálezu (alebo ich polypeptidové fragmenty) môžu byť navyše spojené s inými bioaktívnymi molekulami, najmä s inými cytokinínmi za získania multifunkčných molekúl. Napríklad: C-koncová doména trombopoietinu môže byť spojená s inými cytokinínmi na zosilnenie biologických vlastností alebo účinnosti produkcie. Molekula trombopoietinu je zložená z dvoch domén. Prvá (aminokoncová) doména s približne 150 aminokyselinami je podobná čo do veľkosti a štruktúrou pripomína erytropoietin a iné hematopoietické cytokiníny. Za

prvou doménou je druhá doména približne 180 aminokyselín, ktorej štruktúra nie je významne podobná žiadnej zo známych bielkovinových štruktúr v databáze. Táto druhá doména je vysoko obohatená na N-väzbové glykozylačné miesta a na zvyšky serínu, treonínu a prolínu, ktoré sú znameniami O-väzbových glykozylačných miest. Takto predpokladaný vysoký obsah cukrov napovedá, že táto doména má svoju úlohu v tom, že hydrofóbnu prvú doménu robí pomerne rozpustnejšou. Experimentálne dôkazy potvrdzujú, že cukor spojený s druhou doménou je zapojený do správnej vnútrobunkovej tvorby a sekrécie bielkoviny v priebehu biosyntézy. Druhá doména môže hrať úlohu pri stabilizácii prvej domény proti proteolytickej degradácii alebo predĺženiu *in vivo* polčasu molekuly, a môže spôsobovať prenos biologického signálu alebo špecifickú aktivitu bielkoviny.

Predkladaný vynález poskytuje sériu nových hybridných molekúl, v ktorých je druhá doména TPO spojená s druhým cytokinínom. Je výhodné pripojiť C-koncovú doménu TPO na C-koniec druhého cytokinínu. Spojenie sa výhodne uskutoční manipuláciou na úrovni DNA na zabezpečenie expresie chimérnych molekúl v rekombinantných systémoch produkcie. Výsledné molekuly sa potom testujú na také vlastnosti, akými sú zlepšená rozpustnosť, predĺžený polčas alebo zlepšenie hladiny expresie a sekrécie a farmakodynamika. Konkrétne príklady takýchto chimérnych molekúl zahŕňujú tie, v ktorých je druhá doména TPO pripojená na C-koniec EPO, G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-3 alebo IL-11. Ako sa uvádza vyššie, toto sa vhodne uskutočňuje pomocou zlúčenia DNA. Zlúčená DNA sa potom subklonuje do vhodného vektora expresie a transformuje alebo transfekuje do hostiteľských buniek alebo organizmov známymi metódami. Výsledné zlúčené bielkoviny sa čistia známymi čistiacimi chromatografickými technikami a ich vlastnosti sa porovnávajú s vlastnosťami natívneho, nezlúčeného rodičovského cytokinínu. Takéto hybridné molekuly môžu medzi bielkovinovými alebo polypeptidovými súčasťami navyše obsahovať ďalšie aminokyselinové zvyšky (napr. polypeptidovú spojku).

Tento vynález zahŕňa fragmenty hematopoetických bielkovín

a polynukleotidové molekuly, ktoré kódujú tieto fragmenty. Predmetom zvláštneho záujmu sú fragmenty s dĺžkou aspoň 10 aminokyselín, ktoré sa viažu na MPL receptor a polynukleotidové molekuly s dĺžkou aspoň 30 nukleotidov, ktoré kódujú takéto polypeptidy. Polypeptidy tohto typu sa identifikujú známymi metódami vyhľadávania, akou je digestia intaktnej bielkoviny alebo syntézou malých, prekrývajúcich sa peptidov alebo polynukleotidov (a expresiou posledne uvádzaných), prípadne v spojení s technikami štruktúrnej analýzy, uvádzanými vyššie. Výsledné polypeptidy sa potom testujú na schopnosť špecificky viazať MPL receptor a stimulovať proliferáciu buniek prostredníctvom MPL receptora. Väzba sa stanovuje známymi metódami, akými sú tie, ktoré zverejňuje Klotz, Science 217, 1247, 1982 ("Scatchardova analýza"). Stručne: Rádioaktívne značený testovaný polypeptid sa inkubuje bunkami nesúcimi MPL receptor v prítomnosti zvyšujúcej sa koncentrácie neznačeného TPO. Značený polypeptid viazaný na bunky sa oddelí od voľného značeného polypeptidu centrifugáciou cez ftalátový olej. Afinita väzby testovaného polypeptidu sa stanoví vynesением podielu viazanej značky k voľnej značke na zvislej osi oproti viazanej značke na vodorovnej osi. Väzbová špecifita sa stanoví kompetíciou s cytokinínmi inými ako TPO. Väzbu na receptor je možné stanoviť tiež zrážaním testovanej zlúčeniny imobilizovaným MPL receptorom (alebo jeho ligand-viažúcou doménou). Stručne: Receptor alebo jeho časť sa imobilizujú na nerozpustnej podložke. Testovaná zlúčenina sa označí, napr. metabolickým značením hostiteľských buniek v prípade rekombinantnej testovanej zlúčeniny, alebo konvenčnými *in vitro* značkovacími metódami (napr. rádiojodáciou). Značená zlúčenina sa potom pridá k imobilizovanému receptoru, nenaviazaný materiál sa odstráni, a detekuje sa viazaná označená zlúčenina. V odbore sú známe spôsoby detekcie pre rad značiek. Stimulácia proliferácie sa vhodne stanovuje použitím MTT kolorimetrického testu s bunkami nesúcimi MPL receptor. Polypeptidy sa testujú na aktivitu pri rôznych koncentráciách, najmä v rozsahu 1 nM až 1 mM.

Vynález uvádza i väčšie polypeptidy až do 50 alebo viac zvyškov, výhodne 100 alebo viac zvyškov, výhodnejšie asi 140

alebo viac zvyškov, až do veľkosti celej zrelej bielkoviny. Napríklad: Analýza a modelovanie sekvencie znázornené vo vzorci I od zvyšku 51 po zvyšok 195 vrátane, alebo vo vzorci II od zvyšku 28 po zvyšok 172 vrátane, naznačujú, že tieto časti molekúl sú domény podobné cytokinínom a schopné samostatnej tvorby. Zaujímavé sú tiež molekuly obsahujúce túto základnú cytokinínu podobnú doménu s jedným alebo viacerými ďalšími úsekmi alebo doménami primárneho translačného produktu. Iné polypeptidy, ktoré sú predmetom záujmu, sú zhrnuté v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Myšací TPO (vzorec I)

Cys (zvyšok 51)--Val /zvyšok 196)
 Cys (51)--Pro (206)
 Cys (51)--Thr (379)
 Ser (45)--Cys (195)
 Ser (45)--Val (196)
 Ser (45)--Pro (206)
 Ser (45)--Thr (379)
 Met (24)--Cys (195)
 Met (24)--Val (196)
 Met (24)--Pro (206)
 Met (24)--Thr (379)
 Met (1)--Cys (195)
 Met (1)--Val (196)
 Met (1)--Pro (206)
 Met (1)--Thr (379)

Ludský TPO (vzorec II)

Cys (28)--Val (173)
Cys (28)--Arg (175)
Cys (28)--Gly (353)
Ser (22)--Cys (172)
Ser (22)--Val (173)
Ser (22)--Arg (175)
Ser (22)--Gly (353)
Met (1)--Cys (172)
Met (1)--Val (173)
Met (1)--Arg (175)
Met (1)--Gly (353)

Tí, čo sú zruční v odbore, zistia, že intermediárne formy týchto molekúl (napr. tie, ktoré majú N-konce medzi zvyškami 22 a 28 vzorca II) sú tiež predmetom záujmu, rovnako ako polypeptidy s jednou alebo viacerými aminokyselinovými zámenami, deléciami, inzerciami, alebo N- a C-koncovými rozšíreniami, uvádzanými vyššie. Predkladaný vynález teda poskytuje hematopoetické polypeptidy s aspoň 10 aminokyselinovými zvyškami, výhodne s aspoň 50 zvyškami, výhodnejšie s aspoň 100 zvyškami a najvýhodnejšie s aspoň 140 zvyškami dĺžky, pričom uvedené polypeptidy sú v podstate homológne s polypeptidmi s podobnou dĺžkou podľa vzorca I alebo vzorca II.

Bielkoviny podľa tohto vynálezu môžu byť produkované v bunkách upravených genetickým inžinierstvom podľa známych metód. Vhodnými hostiteľskými bunkami sú tie, ktoré môžu byť transformované alebo transfekované exogénnou DNA a pestované v kultúre, a zahrňujú baktérie, bunky húb a kultivované bunky vyšších eukaryotov. Metódy na manipuláciu klonovanej DNA a na zavádzanie exogénnej DNA do radu hostiteľských buniek sú opísané Sambrookom et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 a Ausubelom et al., *ibid.*, čo je tu zahrnuté ako odkaz.

Všeobecne je DNA sekvencia kódujúca bielkovinu podľa

vynálezu funkčne spojená s promótorom a terminátorom transkripcie vo vektore expresie. Vektor bežne obsahuje jeden alebo viac selekčných markerov a jeden alebo viac začiatkov replikácie, aj keď tí, čo sú zruční v odbore, vedia, že v určitých systémoch môžu byť selekčné markery na oddelených vektoroch a že replikácia exogénnej DNA môže byť zaistená pomocou integrácie do genómu hostiteľskej bunky. Výber promótorov, terminátorov, selekčných markerov, vektorov a iných prvkov, je rutinnou záležitosťou. V literatúre je opísaných veľa takýchto prvkov a tieto sú dostupné od komerčných dodávateľov.

Na smerovanie bielkoviny podľa vynálezu do sekrečnej dráhy hostiteľských buniek sa vo vektore expresie zabezpečuje sekrečná signálna sekvencia (známa tiež ako zavádzacia sekvencia, prepro sekvencia alebo pre sekvencia). Sekrečná signálna sekvencia sa pripojuje na DNA sekvenciu, kódujúcu bielkovinu podľa vynálezu, v správnom čítacom smere. Sekrečná signálna sekvencia sa bežne umiestňuje v 5' smere od DNA sekvencie kódujúcej bielkovinu, aj keď určité signálne sekvencie môžu byť umiestnené inde v DNA sekvencii (viď napr. Welch et al., US patent č. 5 037 743; Holland et al., US patent č. 5 143 830). Sekrečnými signálnymi sekvenciami môžu byť tie, ktoré sú normálne spojené s bielkovinou podľa vynálezu, alebo môžu byť z génu kódujúceho inú secernovanú bielkovinu.

Bunky kvasiniek, najmä bunky rodu *Saccharomyces*, sú výhodným hostiteľom na použitie v rámci tohto vynálezu. Spôsoby transformácie kvasinkových buniek exogénnou DNA a produkcia rekombinantných bielkovín z nich sú zverejnené napríklad v Kawasaki, US patent č. 4 599 311; Kawasaki et al., US patent č. 4 931 373; Brake, US patent č. 4 870 008; Welch et al., US patent č. 5 037 743; a Murray et al., US patent č. 4 845 075, čo je tu zahrnuté ako odkaz. Transformované bunky sa selektujú podľa fenotypu určeného selekčným markerom, bežne rezistenciou na liečivo alebo schopnosťou rásť v neprítomnosti zvláštnej výživnej zložky (napr. leucínu). Výhodným vektorovým systémom na použitie v kvasinkách je vektorový systém POT1, zverejnený Kawasakim et al. (US patent č. 4 931 373), ktorý umožňuje

selekciu transformovaných buniek pomocou rastu na médiách obsahujúcich glukózu. Výhodná sekrečná signálna sekvencia na použitie v kvasinkách je signálna sekvencia génu *MF α 1* *S. cerevisiae* (Brake et al., US patent č. 4 546 082). Vhodné promótory a terminátory na použitie v kvasinkách zahrňujú promótory a terminátory génov glykolytických enzýmov (viď napr. Kawasaki, US patent č. 4 599 311; Kingsman et al., US patent č. 4 615 974; a Bitter, US patent č. 4 977 092, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz) a génov alkoholdehydrogenázy. Viď tiež US patenty č. 4 900 446, 5 063 154, 5 139 936 a 4 661 454. Systémy transformácie pre iné kvasinky vrátane *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago mydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii* a *Candida maltosa* sú v odbore dobre známe. Viď napríklad Gleason et al., *J. Gen. Microbiol.* 132, 3459-3465, 1986 a Cregg, US patent č. 4 882 279.

Bunky iných húb sú taktiež vhodné ako hostiteľské bunky. Napríklad: Bunky *Aspergillus* je možné použiť podľa metód McKnighta et al., US patent č. 4 935 349, ktorý je tu zahrnutý ako odkaz. Spôsoby transformácie *Acremonium chrysogenum* sú zverejnené Suminoom et al., US patent č. 5 162 228, ktorý je tu zahrnutý ako odkaz. Spôsoby transformácie *Neurospora* sú zverejnené Lambowitzom, US patent č. 4 486 453, ktorý je tu tiež zahrnutý ako odkaz.

Kultivované cicavčie bunky sú taktiež výhodným hostiteľom pre použitie v rámci tohto vynálezu. Spôsoby zavádzania exogénnej DNA do cicavčích buniek zahrňujú transfekciu sprostredkovanú fosforečnanom vápenatým (Wigler et al., *Cell* 14, 725, 1978; Corsaro a Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603, 1981; Graham a Van de Eb, *Virology* 52, 456, 1973), elektroporáciu (Neumann et al., *EMBO J.* 1, 841-845, 1982) a transfekciu sprostredkovanú DEAE-dextranom (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987), ktoré sú tu zahrnuté ako odkazy. Produkcia rekombinantných bielkovín v cicavčích bunkách je zverejnená napríklad Levinsonom, US patent č. 4 713 339; Hagenom et al., US

patent č. 4 784 950; Palmiterom et al., US patent č. 4 579 821 a Ringoldom, US patent č. 4 656 134), ktoré sú tu zahrnuté ako odkazy. Výhodné kultivované cicavčie bunky zahrňujú COS-1 (ATCC č. CRL 1650), COS-7 (ATCC č. CRL 1651), BHK (ATCC č. CRL 1632), BHK 570 (ATCC č. CRL 10314), 293 (ATCC č. CRL 1573); Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36, 59-72, 1977) a bunkové línie vaječníkov čínskeho škrečka (napr. CHO-K1, ATCC č. CCL 61). Ďalšie vhodné bunkové línie sú v odbore známe a sú dostupné vo verejných depozitároch, akým je American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Výhodné sú silné transkripčné promotory, akými sú promotory z SV-40 alebo cytomegalovírusu. Viď napr. US patent č. 4 956 288. Iné vhodné promotory zahrňujú promotory metalotioneiových génov (US patenty č. 4 579 821 a 4 601 978, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz) a adenovírusový hlavný neskorý promotor.

Na selekciu kultivovaných cicavčích buniek, do ktorých bola zavedená cudzia DNA, sa bežne používa rezistencia na liečivá. Na takéto bunky sa bežne odkazuje ako na "transfektanty". Na bunky, ktoré sa kultivujú v prítomnosti selekčného činidla a ktoré sú schopné preniesť gén, ktorý je predmetom záujmu, do progénnej populácie, sa odkazuje ako na "stabilné transfektanty". Výhodným selektovateľným markerom je gén kódujúci rezistenciu na antibiotikum neomycin. Selekcia sa uskutočňuje v prítomnosti liečiva neomycinového typu, akým je G-418 alebo podobné. Selektčné systémy je možné použiť tiež na zvýšenie hladiny expresie génu, o ktorý je záujem. Na tento postup sa odkazuje ako na "amplifikáciu". Amplifikácia sa uskutočňuje kultivovaním transfektantov v prítomnosti nízkej hladiny selekčného činidla na selekciu buniek, ktoré produkujú vysoké hladiny produktov zavedených do génov. Výhodným amplifikovaným selektovaným markerom je dihydrofolátreduktáza, ktorá vyznačuje rezistenciu na metotrexát. Je možné používať i iné gény rezistencie na liečivá (napr. rezistencia na hydromycin, multi-drogovú rezistenciu a puromycin acetyltransferázy).

Ako hostiteľov je možné použiť i iné bunky vyšších eukaryotov, vrátane buniek hmyzu, rastlín a vtáčích buniek.

Transformácia buniek hmyzu a produkcia cudzích bielkovín v nich je zverejnená Guarinom et al., US patent č. 5 162 222; Bangom et al., US patent č. 4 775 624 a WIPO publikácii č. 94/06463, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz. Použitie *Agrobacterium rhizogenes* ako vektora na expresiu génov v rastlinných bunkách bolo zhrnuté Sinkarom et al., *J. Biosci. (Bangalore)* 11, 47-58, 1987.

Výhodnými prokaryotickými hostiteľskými bunkami v uskutočnení podľa tohto vynálezu sú kmene baktérie *Escherichia coli*, aj keď vhodným je tiež *Bacillus* a iné rody. Spôsoby transformácie týchto hostiteľov a expresia sekvencií cudzích DNA klonovaných do nich sú v odbore dobre známe (viď napr. Sambrook et al., *ibid.*). Keď sa bielkoviny exprimujú v baktériách, ako je *E. coli*, bielkovina môže ostať v cytoplazme typicky ako nerozpustné telieska, alebo môže byť bakteriálnou sekrečnou sekvenciou smerovaná do periplazmatického priestoru. V prvom menovanom prípade sa bunky lyzujú, telieska sa zhromaždia a zdenaturujú použitím napr. guanidín izotiokyanátu. Denaturované bielkoviny sa potom podrobia novému skladaniu štruktúry pomocou zriedenia denaturačného činidla. V druhom menovanom prípade sa bielkoviny môžu získať z periplazmatického priestoru v rozpustnej a funkčnej forme pomocou rozrušenia buniek (pomocou napr. sonikácie alebo osmotického šoku) za uvoľnenia obsahu periplazmatického priestoru a získania bielkoviny.

Transformované alebo transfekované hostiteľské bunky sa kultivujú podľa známych postupov v kultivačnom médiu obsahujúcom zložky výživy a ďalšie zložky potrebné na rast zvolených hostiteľských buniek. V odbore je známy rad vhodných médií, vrátane definovaných médií a komplexných médií. Všeobecne obsahujú zdroj uhlíka, zdroj dusíka, esenciálne aminokyseliny, vitamíny a minerály. Médiá podľa potreby môžu obsahovať tiež také zložky, ako sú rastové faktory alebo sérum. Rastovým médiom sa obecné selektujú bunky obsahujúce exogénne pridanú DNA pomocou napr. selekcie s liečivom alebo deficiencie na esenciálnu výživnú zložku, ktorá je doplnená selektovateľným markerom, neseným vektorom expresie alebo kotransfekovaným do hostiteľskej bunky.

V rámci tohto vynálezu sa môže na produkciu TPO použiť technológia transgenných zvierat. Je výhodné produkovať bielkoviny v mliečnych žľazách samíc. Expresia v mliečnej žľaze a následná sekrécia bielkoviny do mlieka je sprevádzaná s viacerými ťažkosťami, s ktorými sa stretáva izolácia bielkovín z iných zdrojov. Mlieko sa ľahko zhromažďuje, je dostupné vo veľkých množstvách a má dobré biochemické charakteristiky. Navyše, hlavné bielkoviny mlieka sú v mlieku prítomné vo vysokých koncentráciách (od asi 1 do 15 g/l).

Z komerčného hľadiska je jasné výhodné použitie hostiteľa takého druhu, ktorý má vysoký výťažok mlieka. Aj keď je možné použiť menšie zvieratá, ako sú myši a potkani (a je možné ich preferovať v štádiu overovania koncepcie), v rámci tohto vynálezu je výhodné použiť hospodárske zvieratá bez obmedzenia, ako prasiat, kôz, oviec a hovädzieho dobytku. Zvlášť výhodné sú ovce pre takéto faktory, ako je skoršia história transgenézy s týmto druhom, výťažok mlieka, náklady a bežná dostupnosť zariadenia na zber ovčieho mlieka. Na porovnanie faktorov ovplyvňujúcich výber hostiteľského druhu viď WIPO publikáciu WO 88/00239. Je žiadúce vybrať také plemeno hospodárskeho zvieratá, ktoré bolo vyšľachtené na mliekárenské účely, ako je východná frizská ovca, alebo zaviesť mliekárenský základ šľachtením transgéennej línie v neskoršom termíne. V každom prípade sa musia používať zvieratá so známym a dobrým zdravotným stavom.

Na získanie expresie v mliečnej žľaze sa používa transkripčný promotor z génu mliečnej bielkoviny. Gény mliečnych bielkovín zahŕňujú gény kódujúce kazeíny (US patent č. 5 304 489), β -laktoglobulín, α -laktoalbumín a kyslú bielkovinu srvátky. Výhodný je promotor β -laktoglobulínu (BLG). V prípade promotora génu ovčieho β -laktoglobulínu sa použije oblasť aspoň proximálnych 460 bp zo sekvencie 5' priľahlej ku génu, aj keď výhodné sú väčšie časti 5' priľahlej sekvencie, akou je -4,25 kb úsek DNA, obsahujúci 5' priľahlý promotor s nekódujúcou časťou β -laktoglobulínového génu. Viď Whitelaw et al., *Biochem. J.* 286, 31-39, 1992. Vhodné sú tiež podobné úseky promotorovej DNA z iných druhov.

Do konštrukcie môžu byť začlenené aj iné oblasti β -laktoglobulínového génu, akými sú genómové oblasti génu, ktorý má byť exprimovaný. Všeobecne sa uznáva, že napríklad konštrukcie bez intrónov sa exprimujú zle v porovnaní s tými, ktoré takéto sekvencie DNA obsahujú (viď Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 836-840, 1988; Palmiter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 478-482, 1991; Whitelaw et al., *Transgenic Res.* 1, 3-13, 1991; WO 89/01343; WO 91/02318). Je veľmi výhodné v tomto prípade použiť tam, kde je to možné, genomické sekvencie obsahujúce všetky alebo niektoré z prirodzených intrónov génu kódujúceho bielkovinu alebo polypeptid, ktoré sú predmetom záujmu, a teda je výhodné vloženie aspoň niektorých intrónov napr. z β -laktoglobulínových génov. Jednou takouto oblasťou je úsek DNA, ktorý uabezpečuje zostrih intrónu a RNA polyadenylácie z 3' nekódujúcej oblasti ovčieho β -laktoglobulínového génu. Keď je náhradou prirodzených 3' nekódujúcich sekvencií, môže tento ovčí β -laktoglobulínový úsek zvyšovať a stabilizovať hladiny expresie bielkoviny alebo polypeptidu, o ktorý je záujem. V rámci iných uskutočnení sa oblasť obklopujúca iniciačné ATG v TPO sekvencii nahradí odpovedajúcimi sekvenciami z génov pre špecifické mliečne bielkoviny. Takáto náhrada zaistuje podmienky putatívnej tkanivovej špecifickej iniciácie na zvýšenie expresie. Je vhodné nahradzovať úplné pre-pro a 5' nekódujúce sekvencie sekvenciami napríklad z BLG, aj keď je možné nahradzovať menšie oblasti.

Pre expresiu TPO v transgenných zvieratách sa úsek DNA kódujúci TPO funkčne spojí s ďalšími úsekmi DNA potrebnými na jeho expresiu a na tvorbu jednotiek expresie. Takéto ďalšie úseky zahrňujú vyššie uvedený promótor, ako i sekvencie pre termináciu transkripcie a polyadenylácie mRNA. Jednotky expresie ďalej zahrnú úsek DNA kódujúci sekrečnú signálnu sekvenciu, funkčne spojenú s úsekom kódujúcim TPO. Sekrečná signálna sekvencia môže byť natívna TPO sekrečná signálna sekvencia alebo sekvencia z inej bielkoviny, akou je mliečna bielkovina. Viď napríklad von Heinje, *Nucl. Acids Res.* 14, 4683-4690, 1986 a Meade et al., US patent č. 4 873 316, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz.

Konštrukcia jednotiek expresie na použitie v transgenných zvieratách sa vhodne uskutoční inzerciou TPO sekvencie do plazmidového alebo fágového vektora, obsahujúceho ďalšie úseky DNA, aj keď jednotka expresie môže byť skonštruovaná v podstate ligáciami v akejkoľvek následnosti. Obzvlášť vhodné je zaistiť vektor obsahujúci úsek DNA, kódujúci mliečnu bielkovinu a nahradiť kódujúcu sekvenciu mliečnej bielkoviny sekvenciou, kódujúcou TPO polypeptid a takto vytvoriť génovú fúziu, ktorá obsahuje sekvencie riadiace expresiu génu mliečnej bielkoviny. V každom prípade umožňuje klonovanie jednotiek expresie v plazmidoch alebo iných vektoroch amplifikáciu TPO sekvencie. Je vhodné uskutočňovať amplifikáciu v bakteriálnych (napr. *E. coli*) hostiteľských bunkách, takže vektory typicky obsahujú začiatok replikácie a selektovateľný marker, ktoré sú funkčné v bakteriálnych hostiteľských bunkách.

Jednotka expresie sa potom zavedie do oplodnených vajíčok (vrátane embryí ranného štádia) vybraného hostiteľského druhu. Zavedenie heterológnej DNA je možné dosiahnuť jednou z niekoľkých možností, vrátane mikroinjekcií /napr. US patent č. 4 873 191), retrovírovej infekcie (Jaenisch, *Science* 240, 1468-1474, 1988) alebo riadenej integrácie s použitím embryonálnych kmeňových (ES) buniek (prehľad Bradley et al., *Bio/Technology* 10, 534-539, 1992). Vajíčka sa potom implantujú do vajcovodov alebo maternice pseudopregnatných samičiek a nechajú sa vyvíjať do vrhu. Potomstvo nesúce zavedenú DNA v svojej zárodočnej línii môže prenášať túto DNA do svojej progénnej populácie normálnym Mendelovským spôsobom, čo umožňuje vývoj transgenných stád.

Obecné postupy produkcie transgenných zvierat sú v odbore známe. Viď napríklad Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons et al., *Bio/technology* 6, 844-867, 1988; Wall et al., *Biol. Reprod.* 32, 645-651, 1985; Buhler et al., *Bio/Technology* 9, 835-838, 1991; Krimpenfort et al., *Bio/Technology* 9, 844-847, 1991; Wall et al., *J. Cell. Biochem.* 49, 113-120, 1992; US patenty č. 4 873 191 4 873 316; WIPO

publikácia WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757 a GB 87/00458, čo je tu zahrnuté ako odkaz. Spôsoby zavedenia sekvencií cudzích DNA do cicavcov a ich zárodočných buniek bolo vyvinuté na myšiach. Vid' napr. Gordon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7380-7384, 1980; Gordon a Ruddle, *Science* 214, 1244-1246, 1981; Palmiter a Brinster, *Cell* 41, 343-345, 1985; Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4438-4442, 1985 a Hogan et al., (*ibid.*). Tieto spôsoby boli následne použité na väčších zvieratách, vrátane hospodárskych zvierat (vid' napr. WIPO publikácia WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; Simons et al., *Bio/Technology* 6, 844-867, 1988). V najúčinnnejších doterajších cestách na vytvorenie transgenných myší alebo hospodárskych zvierat sa injektuje niekoľko sto lineárnych molekúl DNA, ktorá je predmetom záujmu, do jedného z pro-jadier oplodneného vajíčka spôsobmi, ktoré sú v odbore považované za štandardné. Je možné použiť i injekcie DNA do cytoplazmy alebo zygoty.

Je možné používať tiež produkciu v transgenných rastlinách. Expresia môže byť zovšeobecnená alebo riadená ku konkrétnemu orgánu, ako je hľuza. Vid' Hiatt, *Nature* 344, 469-479, 1990; Edelbaum et al., *J. Interferon Res.* 12, 449-453, 1992; Sijmons et al., *Bio/Technology* 8, 217-221, 1990; a publikácia Európskeho patentového úradu EP 255 378.

TPO pripravený podľa tohto vynálezu je čistený známymi metódami, akou je napr. afinitné čistenie a separácia založené na veľkosti, náboji, rozpustnosti a iných vlastnostiach tejto bielkoviny. Keď sa bielkovina produkuje v kultivovaných bunkách cicavcov, je výhodné kultivovať bunky v bezsérovom kultivačnom médiu, aby sa obmedzilo množstvo kontaminujúcej bielkoviny. Médium sa zbiera a frakcionuje. Výhodné metódy frakcionácie zahrňujú afinitnú chromatografiu na konkavalíne A alebo inom lektíne, a takto sa využije cukor prítomný na bielkovine. Bielkoviny je možné tiež čistiť s použitím imobilizovanej bielkoviny MPL receptora alebo jeho časti viažúcej ligand alebo s použitím afinitnej značky [tag] (napr. polyhistidínu, substancie P alebo iného polypeptidu alebo bielkoviny, pre ktorú je dostupná protilátka alebo iné špecificky sa viažúce činidlo).

Medzi bielkovinou a afinitnou značkou môže byť zabezpečené špecifické miesto štiepenia.

Bielkoviny podľa tohto vynálezu môžu byť terapeuticky využité všade, kde je to potrebné na zvýšenie proliferácie buniek kostnej drene, ako je tomu pri liečbe cytopenie, akou je cytopenia vyvolaná aplastickou anémiou, myelodysplastickými syndrómami, chemoterapiou alebo kongenitálnou cytopeniou; u pacientov s transplantáciou kostnej drene; u pacientov s transplantáciou kmeňových buniek periférnej krvi a pri liečbe stavov, ktoré spôsobujú zlyhanie kostnej drene, akým je myelodysplastický syndróm. Tieto bielkoviny sú tiež vhodné na zvyšovanie tvorby krvných doštičiek, ako napr. pri liečbe trombocytopenie. Trombocytopenia je spojená s rôznorodou skupinou chorôb a klinických situácií, ktoré môžu pôsobiť samostatne alebo spoločne na vytvorenie tohto stavu. Znížené množstvo doštičiek môže vznikáť pri poruchách ich tvorby (napr. z príčin vrodených väd, akým je Fanconiho syndróm, syndróm trombocytopenia absent radii, Wisott Aldrich, Mayova Hegglinova anomália, Bernard-Soulierov syndróm, minneapolisý syndróm, Epsteinov syndróm, montrealský doštičkový syndróm a Ecksteinov syndróm), abnormálnej distribúcii doštičiek, strát riedením z príčin masívnych transfúzií, rozkladu doštičiek alebo abnormálneho odstraňovania doštičiek v slezine hypersplenických pacientov (napr. z príčin cirhózy alebo kongestívneho srdcového zlyhania). Napríklad: Chemoterapeutické liečivá používané pri terapii nádorov môžu potlačovať vývoj progenitórnych buniek doštičiek v kostnej dreni, výsledná trombocytopenia obmedzuje chemoterapiu a môže byť príčinou nutnosti transfúzií. Navyše môžu určité neoplazie narušovať tvorbu a distribúciu doštičiek. Radiačná terapia, ktorá sa používa na usmrtenie maligných buniek, usmrcuje tiež progenitorné bunky doštičiek. Trombocytopenia môže vznikáť tiež pri rôznych autoimunných poruchách doštičiek, indukovaných liekmi, neonatálnou imunitou, transfúznou aloimunitou doštičiek a vírusovou infekciou (vrátane HIV). Bielkoviny podľa tohto vynálezu môžu znižovať alebo odstraňovať potrebu transfúzií, a takto znižovať incidencia doštičkovej aloimunity. Abnormálny rozklad doštičiek môže byť

výsledkom zvýšenej spotreby doštičiek vo vaskulárnych štePOCH alebo traumatizovanom tkanive, imunitného mechanizmu, spojeného napríklad s trombocytopeniou indukovanou liečivami, idiopatickou trombocytopenickou purpurou (ITP), autoimunitnou chorobou, hematologickými poruchami a lymfómom alebo metastázujúcou rakovinou postihujúcou kostnú dreň. Iné indikácie pre bielkovinu podľa tohto vynálezu zahrňujú aplastickú anémiu a liečivami indukovaný úbytok drene ako následok, napr. chemoterapie alebo liečby infekcie HIV pomocou AZT.

Trombocytopenia sa prejavuje ako zvýšené krvácanie, najmä slizničné krvácanie z nosa a úst alebo gastrointestinálneho traktu, alebo mokvanie rán, vredov a miest infekcie.

Na farmaceutické použitie sa bielkoviny podľa tohto vynálezu formulujú podľa známych metód na parenterálne, najmä intravenózne alebo subkutánne podávanie. Intravenózne podávanie je injekciou alebo infúziou s pravidelným časovým úsekom jednej až niekoľkých hodín. Všeobecne farmaceutické prostriedky obsahujú hematopoetickú bielkovinu v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom, akým je soľný roztok, pufrovaný soľný roztok, 5 % dextróza vo vode a pod. Prostriedky môžu navyše obsahovať jedno alebo viac vehikúl, konzervačné látky, solubilizéry, pufračné činidlá, albumín na zábranu strát bielkoviny na povrchu ampulky, atď. Navyše hematopoetické bielkoviny môžu byť kombinované s inými cytokinínmi, najmä s rýchlo pôsobiacimi cytokinínmi, akým je faktor kmeňových buniek, Il-3, Il-6, Il-11 alebo GM-CSF. Keď sa používa takáto kombinovaná liečba, cytokiníny môžu byť kombinované v jednom prípravku alebo môžu byť podávané v oddelených prípravkoch. Spôsoby formulácie sú v odbore dobre známe a sú zverejnené napr. v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gennaro, vyd. Mck Publishing Co., Easton PA, 1990, čo je tu zahrnuté ako odkaz. Terapeutické dávky sú v rozsahu 0,1 až 100 µg/kg váhy pacienta na deň. výhodne 0,5 až 20 µg/kg na deň s tým, že presnú dávku stanoví kliník podľa zavedených štandardov s ohľadom na povahu a vážnosť stavu, ktorý sa lieči, atď. Stanovenie dávky je na úrovni zručnosti v odbore. Bielkoviny sa bežne podávajú

v priebehu až 28 dní nasledujúcich po chemoterapii alebo transplantácii kostnej drene alebo dokiaľ sa nedosiahne množstvo doštičiek $> 20\ 000\ \text{mm}^3$, výhodne $> 50\ 000/\text{mm}^3$. Bežnejšie sa bielkoviny podávajú v priebehu jedného týždňa alebo kratšie, často v priebehu jedného až troch dní. Terapeuticky účinným množstvom TPO je množstvo dostatočné na vyvolanie klinicky významného vzrastu proliferácie alebo diferenciácie myeloidných alebo lymfoidných progenitorných buniek, ktoré sa prejaví zvýšením hladín zrelých buniek (napr. doštičiek alebo neutrofilov) v obehu. Liečba porúch doštičiek trvá až do dosiahnutia množstva doštičiek aspoň $20\ 000/\text{mm}^3$, výhodne $50\ 000/\text{mm}^3$. Bielkoviny môžu byť tiež podávané v kombinácii s inými cytokinínmi, ako je IL-3, IL-6 a IL-11 faktorom kmeňových buniek, erytropoietin, G-CSF a GM-CSF. Pri kombinovanej liečbe denné dávky iných cytokinínov budú: EPO $\leq 150\ \text{U/kg}$; 5-15 $\mu\text{g/kg}$; IL-3, 1-5 $\mu\text{g/kg}$ a G-CSF 1-25 $\mu\text{g/kg}$. Kombinovaná liečba s EPO je napríklad indikovaná u anemických pacientov s nízkymi hladinami EPO.

Bielkoviny podľa tohto vynálezu sú tiež cenné pre *in vitro* štúdie diferenciácie a vývoja hematopoetických buniek, ako na objasňovanie mechanizmov bunkovej diferenciácie a na stanovenie rodokmeňov zrelých buniek; uplatnenie môžu nájsť tiež ako proliferáčne činidlo v pletivových kultúrach.

Bielkoviny podľa tohto vynálezu môžu byť tiež používané *ex vivo*, ako v autologných kultúrach kostnej drene. Kostná dreň sa odoberie pacientovi pred chematerapiou a spracuje sa s TPO, prípadne v kombinácii s jedným alebo viacerými cytokinínmi. Spracovaná dreň sa potom po chemoterapii vráti pacientovi na urýchlenie nápravy drene. Navyac bielkoviny podľa tohto vynálezu môžu byť používané tiež na *ex vivo* expanziu progenitorných buniek drene alebo periférnej krvi (PBPC). Pred chemoterapeutickou liečbou môže byť dreň stimulovaná faktorom kmeňových buniek (SCP) alebo G-CSF na uvoľnenie progenitorných buniek do periférneho obeh. Tieto progenitory môžu byť odobraté a skoncentrované z periférnej krvi a potom spracované v kultúre s TPO, prípadne v kombinácii s jedným alebo viacerými

cytokinínmi, ako SCF, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-6 alebo IL-11 na diferenciáciu a proliferáciu megakaryotických kultúr s vysokou hustotou, ktoré potom môžu byť vrátené pacientovi po vysokých dávkach chemoterapie.

Vynález poskytuje aj protilátky, ktoré viažu epitopy na bielkovinách podľa vynálezu. Takéto protilátky môžu byť produkované radom prostriedkov známych v odbore. Produkcia monoklonálnych protilátok iných ako ľudských je dobre známa a môže byť uskutočňovaná napríklad imunizáciou zvierat, akým je myš, potkan, zajac, koza, ovca alebo morča, rekombinantným alebo syntetickým TPO alebo ich vybranými polypeptidovými fragmentmi. Výhodné je imunizovať zviera vysoko čistou bielkovinou alebo polypeptidovým fragmentom. Výhodné je tiež podávať bielkovinu alebo polypeptid v kombinácii s pomocnými látkami, akým je Freundov adjuvans, na zvýšenie imunitnej odpovede. Aj keď na indukciu produkcie protilátky vo zvierati môže stačiť jediná injekcia antigénu, všeobecne je výhodné podávať veľkú začiatočnú dávku injekciou nasledovanou jednou alebo viacerými posilňovacími injekciami v období niekoľkých týždňov až niekoľkých mesiacov. Viď napr. Hurrel, vyd., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1982, ktorý je tu zahrnutý ako odkaz. Zo zvierat sa potom odoberie a nechá vyzrážať krv a zo séra sa izolujú protilátky známymi spôsobmi, ako soľnou precipitáciou, ionexovou chromatografiou, afinitnou chromatografiou alebo vysokotlakovou chromatografiou.

Použitie monoklonálnych protilátok je výhodnejšie ako polyklonálnych antisér. Monoklonálne protilátky poskytujú výhody ľahkej produkcie, špecifity a reprodukovateľnosti. Spôsoby produkcie monoklonálnych protilátok sú v odbore dobre známe a sú zverejnené napríklad Kohlerom a Milsteinom (*Nature* 256, 495, 1975 a *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976). Viď tiež Hurrell, *ibid.* a Hart, US patent č. 5 094 941. V stručnosti: Protilátky produkujú bunky, získané z imunizovaných zvierat, sú imortalizované a hodnotené, alebo najprv hodnotené, na produkciu protilátky viažúcej sa na TPO. Pozitívne bunky sa potom

imortalizujú fúziou s myelomovými bunkami. Protilátky iné ako ľudské môžu byť humanizované známymi spôsobmi. Vid' napr. US patent č. 4 816 397, publikácia Európskeho patentového úradu 173 494 a 239 400, WIPO publikácia WO 87/02671 a WO 90/00616, ktoré sú tu zahrnuté ako odkaz. Gény ľudskej konštantnej oblasti sa spájajú s vhodnými ľudskými alebo inými ako ľudskými génmi pre variabilnú oblasť. Napríklad aminokyselinové sekvencie, ktoré reprezentujú väzbové miesta pre antigén (CDR, oblasti určujúce komplementaritu), rodičovské (nie ľudské) monoklonálne protilátky sa rubujú na úrovni DNA na sekvencie ľudskej variabilnej základnej (framework) oblasti. Tieto technológie sú v danom odbore dobre známe a sú napríklad zverejnené Jonesom et al. /*Nature* 322, 323-327, 1989) a Queenom et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033, 1989). Spojené gény sa potom transfekujú do hostiteľských buniek, ktoré sa potom kultivujú známymi spôsobmi. Alternatívne sa bunky, produkujúce protilátky, transfekujú klonovanými génmi pre ľudskú konštantnú oblasť a gény chimerickej protilátky vznikajú homológnoú rekombináciou. Takto je možné zostaviť monoklonálne protilátky tak, že významná časť ich štruktúry je ľudská, a tým zaistiť protilátky, ktoré sú vhodnejšie na opakované podávanie ľudským pacientom.

Jednoreťazové protilátky je možné pripraviť expresiou rekombinantného polypeptidu, ktorý je obecné zložený z variabilnej sekvencie ľahkého reťazca spojennej prostredníctvom spojovacieho polypeptidu, s variabilnou sekvenciou ťažkého reťazca. Spôsoby produkcie jednoreťazových protilátok sú v odbore známe a sú zverejnené napríklad Davisom et al., (*Bio/Technology* 9, 165-169, 1991).

Protilátky viažúce sa na epitopy TPO sú vhodné napríklad v diagnostike chorôb charakterizovaných zníženými hladinami doštičiek, megakaryocytov a iných krvných alebo prognitórnych buniek, pričom tieto choroby sú spojené s deficienciou v proliferácii alebo diferenciacii prognitórnych buniek. Takáto diagnostika sa zvyčajne uskutočňuje testovaním krvi alebo plazmy použitím známych metód imunotestov, akým je enzýmami spojené imunoadsorpčné stanovenie rádioimunotest. Stanovenie tohto typu

je v odbore známe, vid' napríklad Hart et al., *Biochem.* 29, 166-172, 1990, Ma et al., *British Journal of Haematology* 80, 431-436, 1992 a Andre et al., *Clin. Chem.* 38/5, 758-763, 1992. Diagnostické testy môžu byť vhodné na identifikáciu populácií pacientov, ktorí môžu najpravdepodobnejšie mať prospech z terapie TPO. Protilátky na TPO sú tiež vhodné pri čistení TPO, ako pri zakotvení protilátky na pevný nosič, akým je zrnitá matrica naplnená do kolóny, a prietok roztoku obsahujúceho bielkovinu touto kolónou. Naviazaná bielkovina je potom eluovaná príslušným pufrom. Zvyčajne sa bielkovina naväzuje na kolónu pri fyziologických podmienkach nízkej iónovej sily a pri pH blízko neutrálnej hodnoty. Kolóna sa potom premýva na elúciu nenaviazaných kontaminujúcich zložiek. Elúcia naviazanej bielkoviny sa uskutočňuje zmenou iónovej sily a pH, ako napr. s 3M KSCN (jednoducho alebo gradientom) alebo s citrátovým pufrom s nízkym pH. Obyčajne je potrebné vyhnúť sa pH pod asi 2,5.

Tento vynález rieši aj spôsob reprodukcie veľkého množstva megakaryocytov alebo doštičiek, ktoré môžu byť použité napríklad na prípravu knižníc cDNA. Pretože doštičky sú smerované na miesta poranení, predpokladá sa, že sú sprostredkovateľmi hojenia rán a pri určitých podmienkach, sprostredkovateľmi patogenézy. Podrobné pochopenie molekulárnej biológie doštičiek a megakaryocytov by teda mohlo priniesť vysvetlenie funkcie homeostázy a klinicky relevantných porúch funkcie doštičiek. Bielkoviny tohto vynálezu poskytujú lepšie prostriedky na prípravu knižníc cDNA megakaryocytov alebo doštičiek.

Rekombinantný trombopoietín indukuje proliferáciu megakaryocytov z buniek prekursorov, keď je podávaný zvieratám alebo aplikovaný na kultivované bunky sleziny alebo kostnej drene. Expanzia megakaryocytov a ich prekursorov a zrelosť megakaryocytov po podávaní TPO umožňuje izoláciu megakaryocytov vysokej čistoty a v množstve dostačujúcom na izoláciu mRNA a konštrukciu knižníc cDNA. Nastavenie dávkovania TPO a režimu podávania môže byť z primárnych buniek sleziny alebo kostnej drene selektívne expandované megakaryocytmi v skorej alebo úplnej zrelosti a megakaryocytmi, ktoré sa aktívne šíria. Podľa

tohto môžu byť konštruované reprezentatívne cDNA knižnice odpovedajúce skorým, stredným alebo neskorým fázam megakaryopoézie.

Použitie výsledných CDNA knižníc je mnohostranné. Takéto knižnice môžu byť použité napríklad na identifikáciu a klonovanie bielkovín s malým výskytom, ktoré majú úlohu pri rôznych dysfunkciách doštičiek. Lahkosť, s akou je možné doštičky pacienta expandovať a izolovať ich mRNA na analýzu, veľmi napomáha molekulárnemu vyhodnoteniu choroby. Knižnice môžu byť tiež zdrojom na klonovanie nových rastových faktorov a iných bielkovín s potenciálnou terapeutickou využiteľnosťou. Už klonované užitočné doštičkové bielkoviny zahŕňujú rastový faktor odvodený z doštičiek (Ross et al., *Cell* 26, 155-169, 1986), transformujúci rastový faktor (Miletich et al., *Blood* 54, 1015-1023, 1979; Roberts a Sporn, *Growth Factors* 8, 1-9, 1993); z doštičiek odvodený rastový faktor endotelových buniek (Miletich et al., *Blood* 54, 1015-1023, 1979) a PF-4 Doi et al., *Mol. Cell. Biol.* 7, 898-904, 1987; Poncz et al., *Blood* 69, 219-223, 1987). Nové rastové faktory môžu byť identifikované v cDNA knižniciach expresie vyhľadávaním funkčnými testami alebo vyhľadávaním pomocou hybridizácie so sondami známych rastových faktorov pri zníženom predĺžovaní. Navyše: Systematické a úplné DNA sekvenovanie knižnice poskytuje databázu sekvencií cDNA megakaryocytov. V takejto databáze je možné vyhľadávať vhodné sekvencie radom počítačových vyhľadávacích algoritmov.

Megakaryocyty pripravené vyššie opísaným, môžu byť použité tiež na prípravu knižnice bielkovín. Táto knižnica bielkovín je komplementárna ku knižnici cDNA. Informácie o aminokyselinových sekvenciách získané z knižnice bielkovín umožňujú rýchlu izoláciu cDNA kódujúcich bielkoviny, ktoré sú predmetom záujmu. Použitie údajov o sekvenciách bielkovín pre návrhy primerov na izoláciu DNA odstraňuje problémy, ktoré vznikajú pri konvenčných metódach prípravy knižníc na rôznych relatívnych výskyt mRNA. Spojenie knižníc bielkovín a cDNA tiež umožňuje cielené klonovanie sekvencií, o ktoré je zvláštny záujem.

Knižnica bielkovín sa pripravuje extrakciou bielkovín (celkovej bielkoviny alebo frakcie, o ktorú je záujem) z megakaryocytov podľa známych metód, potom separáciou bielkovín dvojrozmernou gélovou elektroforézou. Izolované bielkoviny sa potom podrobia tryptickej digescii *in situ*, nasledovanej separácií pomocou mikroporéznej HPLC. Separované fragmenty sa potom analyzujú hmotnostnou spektrometriou. Výsledný hmotnostný profil sa skúma oproti databáze bielkovinových sekvencií na ododenie identity bielkoviny. Neidentifikované peptidy môžu byť sekvenované Edmanovou degradáciou.

Knižnice cDNA a bielkovín sú cennými zdrojmi nových bielkovín a sekvencií, ktoré ich kódujú. O doštičkách sa myslí, že sú dôležitými sprostredkovateľmi hojenia rán a, za určitých okolností, sprostredkovateľmi patogenezy. Identifikované a charakterizované boli mnohé dôležité bielkoviny doštičiek vrátane rastového faktora odvodeného z doštičiek, transformujúceho rastového faktora- β , z doštičiek odvodeného rastového faktora endotelových buniek a doštičkového faktora 4. Identifikácia a charakterizácia ďalších bielkovín doštičiek by bola veľmi užitočná na objasňovanie procesov, ktoré sú základom hojenia rán a patogenezy, a dalo by sa od nej očakávať, že poskytne dôležité terapeutické činidlá a stratégie.

Ako sa podrobnejšie uvádza nižšie, gén ľudského TPO bol lokalizovaný na chromozóme 3q26. Táto informácia v spojení so sekvenciou génu ľudského TPO (vzorec V) umožňuje priamu diagnózu (genetickým hodnotením) dedičných porúch v géne TPO alebo v regulácii jeho expzie. Takéto poruchy zahŕňujú zmeny v sekvenciách promótoru, ktoré vedú k vzrastu alebo k poklesu hladiny expzie, chromozómovej translokácie v kódujúcich alebo v nekódujúcich oblastiach a juxtapozícii nových regulačných sekvencií k TPO miestu. Diagnostické metódy, ktoré je možné používať, sú v odbore známe. Napríklad: Primery alebo hybridizačné sondy s dĺžkou aspoň 5 nukleotidov, s výhodou s 15 až 30 nukleotidmi alebo viac, môžu byť navrhnuté z genomickej sekvencie a použité na detekciu chromozomálnych abnormalít alebo na meranie hladín mRNA. Rad vhodných detekčných a meracích metód

je v odbore známy, a zahrňuje Southernov prenos, polymerázovú reťazovú reakciu (Mullis, US patent č. 4 683 202) a ligázovú reťazovú reakciu (Barany, *PCR Methods and Applications* 1, 5-16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991). Napríklad: Pacientova DNA môže byť digerovaná jedným alebo viacerými restriktčnými enzýmami a prenesená na nitrocelulózu na vytvorenie "Southern" prenosu. Prenesený materiál sa potom sonduje na detekciu hrubých zmien vo veľkosti fragmentov ako následku mutácií v rekogničnej sekvencii restriktčného miesta. Podľa iného postupu dovoľuje analýzu abnormálnej génovej sekvencie a porovnanie s normálnymi a abnormálnymi sekvenciami návrh primerov, ktoré môžu byť použité na identifikáciu abnormálneho (napr. prerušeného alebo translokovaného) génu. DNA pacienta sa amplifikuje polymerázovou reťazovou reakciou na detekciu amplifikačných produktov charakteristických pre normálny gén alebo pre konkrétne preusporiadanie génu.

Vynález je ďalej objasnený nasledujúcimi neobmedzujúcimi príkladmi uskutočnenia.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Izolácia cDNA ľudského MPL receptora

cDNA kódujúce izoformy ľudských MPL-P a MPL-K receptorov boli izolované z ľudských erytroidných leukemických (HEL) buniek (Martin a Papayannopoulou, *Science* 216, 1233-1235, 1982) reverzne-transkriptázovou polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) s použitím primerov pripravených k publikovanej sekvencii kódujúcej amino- a karboxylové konce týchto receptorov (Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5640-5644, 1992). Templátová cDNA HEL buniek bola syntetizovaná z poly d(T)-selektovanej poly(A)⁺ RNA s použitím primeru ZC5499 (CGAGCCACTT TCTGCACTCC

TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TT). Trinásť μ l poly(A)⁺ RNA HEL buniek s koncentráciou 1 μ g/ μ l bolo zmiešaných s 3 μ l, 20 pmol/ μ l roztoku primeru prvého vlákna ZC5499 (CGAGCCACTT TCTGCACTCC TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TT). Zmes bola zahrievaná na 65 °C 4 minúty a ochladená ľadom.

Syntéza prvého vlákna cDNA bola zahájená pridaním 8 μ l pufru prvého vlákna (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (5x SUPERSRIPT™ pufo, BIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 4 μ l 100 mM ditiotritolu a 3 μ l roztoku deoxynukleotid trifosfátu obsahujúceho po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-metyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ). Reakčná zmes bola zahrievaná na 45 °C 4 minúty s následným pridaním 10 μ l 200 U/ μ l roztoku RNázy H⁻ reverznej transkriptázy (SUPERSRIPT™ reverzná transkriptáza, GIBCO BRL) k zmesi RNA-primer. Reakcia bola inkubovaná pri 45 °C 1 hodinu s následnou inkubáciou pri 50 °C 15 minút. Do reakcie bolo pridaných 60 μ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) a nasledovala chromatografia cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (CHROMA SPIN+TE400™, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) na odstránenie nadbytku primeru.

cDNA prvého vlákna HEL buniek sa použila ako templát na amplifikáciu ľudského MPL-P receptora s použitím primerov odpovedajúcich oblasti kódujúcej amino- a karboxylové konce receptorovej bielkoviny (Vigon et al., ibid.). Každý primer tiež zahrňoval rôzne restriktčné enzýmové štiepiace miesto, ktoré slúžilo na smerovanie klonovania amplifikovaného produktu (ZC5746, GAGAGAGAGA GAGAAATTCAT GCCCTCCTGG GCCCTCTTCA TGGTC, obsahoval Eco RI miesto; ZC5762, AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT, obsahoval Xho I miesto). Bola pripravená 100 μ l reakčná zmes, ktorá obsahovala 10 ng templátovej cDNA, po 50 pmólov primerov, 200 μ M každý deoxynukleotid trifosfát Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 1 μ l 10x PCR pufru (Promega Corp., Madison, WI) a 10 jednotiek Tag polymerázy (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). Polymerázová reťazová reakcia prebiehala v 35 cykloch (1 minúta pri 95 °C, 1 minúta pri 60 °C a 2 minúty pri 72 °C, s jednou

ďalšou sekundou pridávanou v každom nasledujúcom cykli), s nasledujúcou 10 minútovou inkubáciou pri 72 °C.

cDNA ľudského *MPL-K* receptora bola izolovaná amplifikáciou polymerázovou reťazovou reakciou z cDNA HEL buniek spôsobom identickým s cDNA *MPL-P* receptora, ako je to opísané vyššie, až na to, že primer ZC5762, AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT bol nahradený ZC5742 (GACCCTGGAG CYGCGCCCGC GATCTCGCTA). PCR primer ZC5742 je špecifický pre 3' koniec ľudskej *MPL-P* cDNA a zahrňoval *Xho* I miesto na uľahčenie klonovania.

Reakčné produkty boli extrahované 2-krát fenol/chloroformom (1:1), potom raz chloroformom a boli vyvrážané etanolom. Po digescií *Eco* RI a *Xho* I boli produkty frakcionované na 0,8 % géli málo roztápajúcej sa agarózy (SEA PLAQUE GTG™ málo roztápajúca sa agaróza; FMC Corp., Rockland, ME). 1,9 Kb amplifikovaný produkt odpovedajúci cDNA ľudského *MPL-P* receptora a 1,7 Kb amplifikovaný produkt odpovedajúci cDNA ľudského *MPL-K* receptora boli získané z vyrezaných prúžkov gélu digesciou gélovej matrice β -agarázou (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) s nasledovným vyvrážaním etanolom. cDNA boli subklonované do vektora pBluescript[®] SK+ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) na overenie sekvenovaním.

Príklad 2

Izolácia cDNA myšieho *MPL* receptora

Boli odobraté sleziny z C57BL/KsJ-db/db myš a okamžite boli dané do kvapalného dusíka. Celková RNA z tkaniva slezín bola pripravená s použitím guanidín izotiookyanátu (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18, 52-94, 1979) s následnou CsCl centrifugáciou. Slezinná poly(A)+RNA bola izolovaná chromatograficky na oligo d(T) celulóze (Aviv a Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412, 1972).

7,5 μ l poly d(T)-selektovanej poly(A)+RNA slezín myš s

koncentráciou 1,7 µg/µl bolo zmiešaných s 3 µl 20 pmol/µl roztoku primeru prvého vlákna ZC6091 (GAGCACAGAA TTCACTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT) obsahujúceho restriktčné miesto Not I. Zmes bola zahrievaná na 65 °C 4 minúty a ochladená ľadom. Syntéza prvého vlákna cDNA bola zahájená pridaním 8 µl 250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (5x SUPERSCRIPT™ pufoer, BISCO BRL, Gaithersburg, MD), 4 µl 100 mM ditiotreitolu a 3 µl roztoku deoxynukleotid trifosfátu obsahujúceho po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-metyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) k zmesi RNA-primer. Reakčná zmes bola inkubovaná pri 45 °C 4 minúty s následným pridaním 10 µl 200 U/µl roztoku RNázy H⁻ reverznej transkriptázy (GIBCO BRL). Účinnosť syntézy prvého vlákna bola analyzovaná v paralelnej reakcii pridaním 10 µCi ³²P-αdCTP k 10 µl pomernej reakčnej zmesi na značenie reakcie pre analýzu. Reakcie boli inkubované pri 45 °C 1 hodinu s následnou inkubáciou pri 50 °C 15 minút. Neinkorporovaný ³²P-αdCTP v označenej reakcii bol odstránený chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (CHROMA SPIN + TE400™, Clontech Laboratories Inc.). Neinkorporované nukleotidy v reakcii neoznačeného prvého vlákna boli odstránené dvojitým zrážaním cDNA v prítomnosti 8 µg glykogénového nosiča, 2,5 M octanu amonného a 2,5 objemom etanolu. Neoznačená cDNA bola resuspendovaná v 50 µl vody na použitie pri syntéze druhého vlákna. Dĺžka označeného prvého vlákna cDNA bola stanovená elektroforézou v agarózovom géli.

Syntéza druhého vlákna bola uskutočnená na prvom vlákne cDNA v podmienkach, ktoré podporujú štartovanie syntézy druhého vlákna prvým vláknom s výslednou tvorbou DNA slučiek. Reakčná zmes sa pripravovala pri izbovej teplote a skladala sa z 50 µl cDNA neoznačeného prvého vlákna, 16,5 µl vody, 20 µl 5 x pufru pre polymerázu I (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 1 µl 100 mM ditiotreitolu, 2 µl roztoku obsahujúceho po 10 mM koncentrácii všetkých deoxynukleotid trifosfátov, 3 µl 5 mM roztoku β-NAD, 15 µl 3 U/µl roztoku *E. coli* DNA ligázy (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 5 µl 10 U/µl roztoku *E. coli* DNA polymerázy I (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Reakcia bola inkubovaná 5 minút pri

izbovej teplote s nasledovným pridaním 1,5 μ l 2 U/ μ l roztoku RNázy H (GIBCO BRL). Na sledovanie účinnosti syntézy druhého vlákna bola použitá paralelná reakcia, v ktorej bolo 10 μ l pomernej časti zmesi na syntézu druhého vlákna označených 10 μ Ci ^{32} P- α dCTP. Reakcie boli inkubované pri 15 °C dve hodiny s následnou inkubáciou 15 minút pri izbovej teplote. Neinkorporovaný ^{32} P- α dCTP v označenej reakcii bol pred analýzou pomocou elektroforézy v agarózovom géli odstránený chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (CHROMA SPIN + TE100™, Clontech Laboratories Inc.). Neoznačená reakcia bola ukončená dvojitou extrakciou fenol/chloroformom (1:1) a extrakciou chloroformom, s následnou etanolovou precipitáciou v prítomnosti 2,5 M octanu amonného.

Jednovláknová DNA v štruktúre sľučky bola štiepená použitím rastlinnej ("mung bean") nukleázy. Reakčná zmes obsahovala 100 μ l cDNA druhého vlákna, 20 μ l 10x nukleázového pufru (Stratagene Cloning Systems La Jolla, CA), 16 μ l 100 mM ditiotritolu, 51,5 μ l vody a 12,5 μ l 1:10 riedenej "mung bean" nukleázy (Promega Corp., konečná koncentrácia 10,5 U/ μ l) v zriedenom "mung bean" nukleázovom pufri. Reakcia bola inkubovaná pri teplote 37 °C 15 minút. Reakcia bola skončená pridaním 20 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8,0 s následnou postupnou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom, ako je to uvedené vyššie. Po extrakcii bola DNA zrážaná v etanole a resuspendovaná vo vode.

V resuspendovanej cDNA boli zastúpené konce T4 DNA polymerázou. cDNA, ktorá bola resuspendovaná v 190 μ l vody, bola zmiešaná s 50 μ l 5x T4 DNA polymerázového pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl₂), 3 μ l 0,1 M ditiotritolu, 3 μ l roztoku obsahujúceho po 10 mM koncentrácií všetkých deoxynukleotid trifosfátov, 4 μ l 1 U/ μ l roztoku T4 DNA polymerázy (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN). Po inkubácii 1 hodiny pri 10 °C bola reakcia ukončená pridaním 10 μ l 0,5 M EDTA s následnou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom, ako je to uvedené vyššie. DNA bola chromatografovaná cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) na odstránenie

stopových množstiev bielkovín a na odstránenie krátkych cDNA s dĺžkou menej ako -400bp. cDNA bola zrážaná etanolom v prítomnosti 12 µg glykogénového nosiča a 2,5 M octanu amonného a bola resuspendovaná v 10 µl vody. Na základe inkorporácie ³²P-αdCTP bol výťažok cDNA -2 µg zo začiatočných 12,5 µg mRNA templátu.

Na 5' konce tejto cDNA boli zaligované *Eco* RI adaptéry na umožnenie klonovania do lambdy fágového vektora. 10 µl pomernej časti cDNA (-2 µg) a 10 µl 65 pmol/µl roztoku *Eco* RI adaptérov (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) bolo zmiešaných s 2,5 µl 10x ligázového pufru (Promega Corp.), 1 µl 10 mM ATP a 2,5 µl 15 U/µl roztoku T4 DNA ligázy (Promega Corp.). Reakcia bola inkubovaná cez noc (-18 hodín) pri teplote 0 °C až 18 °C 15 minút. Reakcia bola ďalej inkubovaná cez noc pri 12 °C a skončená pridaním 75 µl vody a 10 µl 3 M octanu sodného, s nasledujúcou inkubáciou pri 65 °C 30 minút. Po inkubácii bola cDNA extrahovaná fenol/chloroformom a chloroformom, ako je to opísané vyššie a precipitovaná v prítomnosti 2,5 M octanu amonného a 1,2 objemom izopropanolu. Po centrifugácii bola cDNA peleta preplachovaná 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 89 µl vody.

Na zabezpečenie jednosmerného klonovania tejto cDNA do lambda fágového vektora bola táto cDNA digеровaná *Not* I, čím vznikla cDNA s 5' *Eco*RI a 3' *Not* I lepivými koncami. Restričné miesto *Not* I na 3' konci cDNA bolo najprv zavedené s primerom ZC6091 (GAGCACAGAA TTCACTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT). Digescia restričným enzýmom bola robená v reakcii obsahujúcej 89 µl cDNA opísanej vyššie, 10 µl 6 mM ris-HCl, 6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT }10x D pufor, Promega Corp., Madison, WI) a 1 µl 12 U/µl *Not* I (Promega Corp.). Reakcia bola ukončená čiastkovou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom. cDNA bola zrážaná etanolom, premývaná 70 %-ným etanolom, sušená na vzduchu a resuspendovaná v 20 µl 1x nakladacieho gélového pufru (10 mM Tris.HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % glycerol a 0,125 % brómfenolová modrá).

Resuspendovaná cDNA bola zahriata na 65 °C 5 minút, ochladená ľadom a podrobená elektroforéze na 0,8 % géli nízkotaviacej sa agarózy (SEA PLAQUE GTG™ nízkotaviaca sa agaróza, FMC Corp.). Neinkorporované adaptéry a cDNA pod dĺžkou 1,6 Kb boli vyrezané z gélu. Elektródy boli prehodené a cDNA bola podrobená elektroforéze dovtedy, kým sa neskoncentrovala blízko začiatku dráhy. Oblasť s obsahom skoncentrovanej cDNA bola vyrezaná a vložená mikrocentrifugačnej skúmavky a bol stanovený približný objem rezu gélu. Do skúmavky bola pridaná alikvótna časť vody (300 µl), približne trojnásobok objemového rezu gélu a agaróza bola roztavená zahriatím na 65 °C v čase 15 minút. Po ekvilibracii vzorky na 42 °C bolo pridaných 10 µl 1 U/µl β-agarózy (New England Biolabs, Inc.) a zmes bola inkubovaná 90 minút na digestiu agarózy. Po inkubácii bolo k vzorke pridané 40 µl 3 M octanu sodného a zmes bola inkubovaná na ľade 15 minút. Vzorka bola centrifugovaná pri 14 000 x g 15 minút pri izbovej teplote na odstránenie nevytluhovanej agarózy. cDNA bola zo supernatantu vyzrážaná etanolom, premytá 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 37 µl vody na kinázovú reakciu na fosforyláciu zaligovaných Eco RI adaptérov.

K 37 µl roztoku cDNA opísaného vyššie sa pridalo 10 µl 10x ligázového pufru (Stratagene Cloning Systems) a zmes bola zahrievaná na 65 °C 5 minút. Zmes bola ochladená na ľade a bolo pridaných 5 µl 10 mM ATP a 3 µl 10 U/µl T4 polynukleotid kinázy (Stratagene Cloning Systems). Reakcia bola inkubovaná pri 37 °C 45 minút a ukončená zahrievaním na 65 °C 10 minút s nasledujúcou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom. Fosforylovaná cDNA bola zrážaná etanolom v prítomnosti 2,5 M octanu amonného, premytá 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 12,5 µl vody. Koncentrácia fosforylovanej cDNA bola stanovená na -40 fmol/µl.

Výsledná cDNA bola klonovaná do lambda fágového vektora ExCell™ (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), zakúpeného ako predigerovaného s Eco RI a Not I a defosforylovaného. Spojenie cDNA do vektora sa urobilo v reakcii obsahujúcej 2 µl 20 fmol/µl preparovaných ramien ExCell™, 4 µl vody, 1 µl 10x

ligázového pufru (Promega Corp.), 2 μ l 40 fmol/ μ l cDNA a 1 μ l 15 U/ μ l roztoku T4 DNA ligázy (Promega Corp.). Spojenie sa robilo 48 hodín pri 4 °C. Približne 50 % ligačnej zmesi bolo "zbalených" do fágu použitím "baliaceho" extraktu GIGAPACK® II Gold (Stratagene Cloning Systems) podľa inštrukcií výrobcu. Výsledná knižnica cDNA obsahovala viac ako $1,5 \times 10^7$ nezávislých rekombinantov s hladinou pozadia fágov bez vložiek menšou ako 1,5 %.

Na izoláciu cDNA myšieho MPL receptora z fágovej knižnice cDNA myšej sleziny sa použila sonda ^{32} P-označenej cDNA ľudského MPL-K receptora. Knižnica cDNA bola nanosená na bunky *E. coli* kmeňa SURE® (Stratagene Cloning Systems) pri hustote 40 000 až 50 000 PFU/misku s priemerom 150 mm. Fágové plaky z 33 misiek boli prenesené na nylonové membrány (Hybond™, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) a spracované podľa inštrukcií výrobcu. Spracované filtre boli vystavené vo vákuovej peci teplote 80 °C 2 hodiny a nasledovalo niekoľko premytí pri teplote 70 °C v premývacom pufri (0,25 x SSC, 0,25 % SDS, 1 mM EDTA) a prehybridizácia cez noc pri teplote 65 °C v hybridizačnom roztoku (5 x SSC, 5 x Denhardtov roztok, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA a 100 μ g/ml tepelne denaturovanej DNA lososieho spermatu) v hybridizačnej peci (model HB-2, Techne Inc., Princeton, NJ). Po prehybridizácii bol hybridizačný roztok odstránený a nahradený čerstvým hybridizačným roztokom obsahujúcim asi 2×10^6 cpm/ml ^{32} P-označenej cDNA ľudského MPL-K pripravenej s použitím komerčne dostupnej súpravy pre označenie (súprava MEGAPRIME™, Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Pred pridaním do hybridizačného roztoku bola sonda denaturovaná pri 98 °C 5 minút. Hybridizácia sa uskutočnila cez noc pri 65 °C. Filtre boli premývané pri 55 °C v premývacom pufri (0,25 x SSC, 0,25 % SDS, 1 mM EDTA) a autorádiografované s intenzifikačnou fóliou v priebehu 4 dní pri teplote -70 °C na XAR-5 film (Kodak Inc., Rochester, NY). Použitím autorádiogramu ako templátu boli z oblastí misiek odpovedajúcich primárnym signálom získané agarové valčeky a ponorené do SM (0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 % želatína) na elúciu fága na čistenie plaku. Bolo izolovaných 7 fágov čistených plakov, ktoré niesli inzerty

hybridizujúce sa sondou ľudského *MPL-K* receptora. Fagemidy obsiahnuté v rámci ExCell™ fágov boli získané použitím *in vivo* rekombinačného systému v súlade s inštrukciami dodávateľa. Identita cDNA inzertov bola potvrdená sekvenovaním DNA.

Izolované klony kodovali bielkovinu, ktorá mala vysoký stupeň sekvenčnej identity s ľudským *MPL-P* receptorom a s nedávno oznámeným myším *MPL* receptorom (Skoda et al., *EMBO J.* 12, 2645-2653, 1993). Sedem klonov spadalo do dvoch tried, ktoré sa od seba odlišovali tromi klonmi majúcimi deléciu sekvencií kódujúcich postupnosť 60 aminokyselinových zvyškov blízko N-konca. Na cDNA kódujúcu bielkovinu bez tejto delécie sa odkazuje ako na cDNA *MPL* receptora typu I. cDNA *MPL* receptora typu II chýbali sekvencie kódujúce zvyšky 131 až 190 receptora typu I, vzorec VI. Navyše sa receptory typu I a II líšili od oznámenej sekvencie myšieho *MPL* receptora (Skoda et al., *ibid.*) prítomnosťou sekvencie kódujúcej aminokyselinové zvyšky Val-Arg-Thr-Ser-Pro-Ala-Gly-Glu vnesené za aminokyselinový zvyšok 222 a substitúciou glycinového zvyšku serínom v pozícii 241 (pozície odkazujú na myšiu receptor typu I).

cDNA myších *MPL* receptorov typu I a II boli na expresiu v cicavčích bunkách subklonované do plazmidového vektora pHZ-1. Plazmid pHZ-1 je vektor expresie, ktorý môže byť použitý na expresiu bielkovín v cicavčích bunkách alebo v translačnom systéme žabích oocytov z mRNA, ktoré boli transkribované *in vitro*. Jednotka expresie pHU-1 zahŕňa promotor myšieho metalotioneínu.1, promotor bakteriofágu T7 s priradenými mnohopočetnými klonovacími okrajmi, obsahujúcimi unikátne restriktčné miesta pre inzerciu kódujúcich sekvencií, terminátor ľudského rastového hormónu a terminátor bakteriofágu T7. Navyše pHZ-1 obsahuje *E. coli* začiatok replikácie, bakteriálny β -laktamázový gén, jednotku expresie cicavčieho selekčného markera, zahrňujúceho SV40 promotor a začiatok replikácie, a gén rezistencie na neomycín a SV40 transkripčný terminátor. Na zabezpečenie jednosmerného klonovania do pHZ-1 bola použitá polymerázová reťazová reakcia s príslušnými primermi na vytvorenie *Eco* RI miesta, resp. *Xho* I miesta, pred kodónom

translačnou iniciáciou, resp. za translačným terminačným kodónom. Polymerázová reťazová reakcia sa uskutočňovala v zmesi obsahujúcej 10 μ l 10x ULTMATTM DNA polymerázového pufru (Roche molecular Systems, Inc., Branchburg NJ), 6 μ l 25 mM MgCl₂, 0,2 μ l roztoku deoxynukleotid trifosfátov obsahujúceho po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 2,5 μ l 20 pmol/ μ l roztoku primeru ZC6603 (GAGGAATTCG CAGAAGCCAT GCCCTCTTGG GCCCTCTTCA TGGTC), 2,5 μ l 20 μ mol/ μ l roztoku primeru ZC5762 (AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT), 32,8 μ l vody, 1 μ l kultúry baktérií skorej logaritmickkej fázy obsahujúcej plazmid myšieho MPL receptora buď typu I alebo typu II a 1 μ l 6U/ μ l DNA polymerázy (ULTMATTM polymeráza, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). V reakcii bol použitý AmpliWaxTM (Roche Molecular Systems, Inc.) podľa inštrukcií dodávateľa. Polymerázová reťazová reakcia prebiehala 25 cyklov (1 minúta pri 95 °C, 1 minúta pri 55 °C a 3 minúty pri 72 °C. Amplifikované produkty boli extrahované fenol/chloroformom a chloroformom a vyzrážané etanolom v prítomnosti 6 μ g glykogénového nosiča a 2,5 M octanu amonného. Pelety boli resuspendované v 87 μ l vody, do ktorej sa pridalo 10 μ l 10 x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.), 2 μ l 10 U/ μ l Eco RI (Boehringer Mannheim) a 1 μ l 40 U/ μ l Xho I (Boehringer Mannheim Corp.). Digescia prebiehala 1 hodinu pri 37 °C. Reakcia bola ukončená zahriatím na 65 °C po dobu 15 minút a chromatografovaná cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (CHROMA SPIN + TE400TM, Clontech Laboratories Inc.).

Izolované receptorové inzerty opísané vyššie boli ligované do Eco RI a Xho I digerovaného a defosforylovaného vektora pHZ-1. Ligačná reakcia obsahovala 1 μ l 50 ng/ μ l upraveného pHZ-1 vektora, 5 μ l 5 ng/ μ l cDNA inzertu, 2 μ l 10x ligázového pufru (Promega Corp.), 11,75 μ l vody a 0,25 μ l 4 U/ μ l roztoku T4 DNA ligázy (Stratagene Cloning Systems). Ligácia prebiehala pri teplote 10 °C cez noc. Ligované DNA boli transfekované do *E. coli* (MAX EFFICIENCY DH108TM kompetentné bunky, GIBCO BRL) v súlade s inštrukciami výrobcu. Platnosť inzertov myšieho MPL-P receptora v pHZ-1 bola potvrdená sekvenovaním DNA. Výsledné plazmidy pSLmp1-8, resp. pSLmp1-9 niesli cDNA myšieho MPL

receptora typu I, resp. typu II. Plazmid pSLmp1-44 niesol inzert cDNA ľudského *MPL-P* receptora.

Príklad 3

Konštrukcia BaF3 bunčných línií exprimujúcich MPL receptory

BaF3, pre-lymfoidná, od interleukinu-3 závislá bunčná línia, odvodená z myšej kostnej drene (Palacios a Steinmetz, *Cell* 41, 727-734, 1985, Methey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6, 4133-4135, 1986) bola udržiavaná v kompletnom médiu (RPMI 1640 médium, JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), doplnenom 10 % tepelne inaktivovaného fetálneho bovinného séra, 4 % kondicionovaného média z kultivovaných WEHI-3 buniek (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), 2 mM glutamínom, 2-merkaptotanolom (finálna konc. 1 : 280 000) a PSN antibiotikami (GIBCO BRL). Pred elektroporáciou do buniek BaF3 boli plazmidy pSLmol-8, pSLmp1-9 a pSLmp1-44 čistené s céziom chloridom, linearizované v mieste *Nde* I. Bunky BaF3 boli pre elektroporáciu premyté raz v RPMI 1640 médiu a resuspendované v RPMI 1640 médiu na hustotu 10^7 buniek/ml. Po 1 ml resuspendovaných buniek BaF3 bolo zmiešaných s 30 µg DNA každého z linearizovaných plazmidov a zmesi boli prenesené do oddelených jednorázových elektroporačných komôrok (GIBCO BRL). Po asi 15 minútovej inkubácii pri izbovej teplote bunky dostali sériu dvoch šokov (800 µFad/300 V, 1180 µFad/300 V) dodaných elektroporačným prístrojom (CELL-PORATOR™, GIBCO BRL). Po 5 minútach boli elektroporované bunky prenesené do 10 ml kompletného média a umiestnené na 15 až 24 hodín do inkubátora (37 °C, 5 % CO₂). Potom boli bunky oddelené a resuspendované v 10 ml kompletného média obsahujúceho 1600 µg/ml G418 a nanesené v limitujúcich riedeniach na 96-jamkové doštičky pre pletivové kultúry na izoláciu G418-rezistentných klonov. Na expresiu MPL receptorov v G418-rezistentných BaF3 klonoch sa podľa "Northenovej" analýzy posudzovala prítomnosť MPL receptorových transkriptov v BaF3 mRNA. V bunčnej línii označenej BaF3/MPLR1.1 bola zistená vysoká hladina expresie mRNA myšieho MPL receptora typu I a táto línia bola používaná na následné testy s MPL ligandovou aktivitou v kondicionovaných

médiách transfekovaných buniek BHK 570. Bunečná línia exprimujúca mRNA receptora typu II bola označená BaF3(MPLR2).

Príklad 4

Produkcia rozpustného myšieho MPL receptora

Cicavčí plazmid expresiu kódujúci rozpustný myší MPL receptor typu I (pLDmp1-53) bol vytvorený spojením segmentu DNA z pSLmp1-9, cicvčieho plazmidu expresie, obsahujúceho cDNA kódujúcu myší MPL receptor typu I, ako je to opísané vyššie úplnej dĺžky, so segmentom DNA z pSLmp1-25, plazmidu expresie konštruovaného na produkciu rozpustného myšieho MPL receptora typu I v baktériách.

cDNA segment kódujúci rozpustný myší MPL receptor typu I bol izolovaný PCR s použitím primerov ZC6704 (GAAGAGGAAT TCACCATGGA TGTCTTCTTG CTGGCCTTGG GCACAGAG) a ZC6703 (CGACTTTACC TCGATGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC) a ako templátu plazmidu pSLmp1-9 s receptorom úplnej dĺžky. Na zabezpečenie jednosmerného klonovania boli do primerov ZC6704, resp. ZC6703 v ich 5' koncoch zahrnuté restričné miesta Eco RI, resp. Xho I. Primer ZC6703 tiež kódoval v správnom čítacom rámci zhodnú cieľovú sekvenciu proteín kinázy na umožnenie *in vitro* označenia čisteného rozpustného receptora ^{32}P - γ -ATP (Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 558-562, 1989). PCR sa robila v zmesi obsahujúcej 10 μl 10x ULTIMATM DNA polymerázového pufru (Roche Molecular Systems, Inc.), 6 μl 25 mM MgCl_2 , 0,2 μl roztoku deoxynukleotid trifosfátov obsahujúcich po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 11 μl 4,55 pmol/ μl roztoku primeru ZC6704 (GAAGAGGAAT TCACCATGGA TGTCTTCTTG CTGGCCTTGG GCACAGAG), 21 μl 2,43 pmol/ μl roztoku primeru ZC6703 (CGACTTTACC TCGATGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC), 50,3 μl vody, 1 μl 50 ng/ μl pSLmp1-9 digenerovaného Hind III a Xba I, a 1 μl 6U/ μl ULTIMATM DNA polymerázy (Roche Molecular Systems, Inc.). V reakcii bol použitý AmpliWaxTM (Roche Molecular Systems, Inc.) podľa inštrukcií dodávateľa. Polymerázová reťazová reakcia prebiehala

3 cykly (1 minúta pri 95 °C, 1 minúta pri 50 °C a 2 minúty pri 72 °C), s nasledujúcimi 11 cyklami pri zvýšenej "stringencii" hybridizácie (1 minúta pri 95 °C, 30 sekúnd pri 55 °C a 2 minúty pri 72 °C), s nasledujúcou 10 minútovou inkubáciou pri 72 °C. Amplifikované produkty boli sériovo extrahované fenol/chloroformom a chloroformom, s nasledujúcou chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (Clontech Laboratories Inc.). PCR produkt bol zrážaný etanolom v prítomnosti 20 µg glykogénového nosiča a 2,5 M octanu amonného. Peleta bola resuspendovaná v 32 µl vody. K 16 µl resuspendovaného PCR produktu bolo pridaných 2 µl 10x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.), 1 µl 10 U/µl Eco RI a 1 µl 40 U/µl Xho I (Boehringer Mannheim Corp.). Digestia prebiehala 1 hodinu pri 37 °C a bola ukončená zahriatím na 65 °C po 15 minút. Produkt bol čistý na 0,7 % géli nízkotavnej agarózy. Získanie fragmentu z nízkotavnej agarózy sa urobilo digestiou gélovej matrice β-agarázou (New England Biolabs).

Výsledný PCR produkt kódoval N-koncovú extracelulárnu doménu myšieho MPL receptora typu I (zvyšky 27 až 480 vzorca VI). Pri neprítomnosti putatívnej receptorovej transmembránovej domény (zvyšky 483 až 504 vzorca VI) sa očakáva, že exprimovaná bielkovina bude v prítomnosti vhodného signálneho peptidu secernovaná. Myšia cDNA kódujúca rozpustný MPL receptor typu II bola získaná použitím PCR podmienok opísaných vyššie až na to, že ako templát bol použitý pSLmp1-8. Platnosť oboch fragmentov receptorov bola potvrdená sekvenovaním DNA.

Fragmenty DNA kódujúce myšie rozpustné MPL receptory typu I a typu II boli klonované do Eco RI a Xho I digerovaného vektora pOmpA2-5 za vzniku pSLmp1-26, resp. pSLmp1-27. Plazmid pOmpA2-5 je modifikácia pOmpA2 (Ghrayab et al., EMBO J. 3, 2437-2422, 1984), bakteriálneho vektora exprese navrhnutého na smerovanie rekombinantnej bielkoviny do periplazmatického priestoru. pOmpA2-5 bol skonštruovaný náhradou 13 bp sekvencie medzi Eco RI a Bam HI miestami pOmpA2 syntetickou 42 bp sekvenciou. Sekvencia bola vytvorená hybridizáciou dvoch 42 nukleotidových komplementárnych oligonukleotidov (ZC6707,

AATTCGCCAT, GGGACTCGAG CATCACCATC ACCATCACTG AG A ZC6706, GATCCTCAGT GATGGTGATG GTGATGCTCG AGTCCCATGG CG), ktoré pri spárovaní báz vytvorili *Eco* RI a *Bam* HI lepivé konce, čo zabezpečilo jednosmerné klonovanie do *Eco* RI a *Bam* HI digerovaného pOmpA2. Vo vnútri vloženej sekvencie je *Xho* I miesto v rovnakom čítacom rámci ako bakteriálna zavádzacia sekvencia a kódujúca cDNA myšieho rozpustného MPL receptora, ako i úsek 6 histidínových kodónov v rovnakom rámci, lokalizovaný 3' od *Xho* I miesta, na umožnenie čistenia rekombinantnej bielkoviny pomocou kovovo-chelátovej afinitnej chromatografie (Houchuli et al., *Bio/Technology* 6, 1321-1325, 1988). Za sekvenciou kódujúcou histidínový úsek nasledoval terminačný kodón v rovnakom rámci. Platnosť pOmpA2-5, pSLmp1-26 a pSLmp1-27 bola overená sekvenovaním DNA.

pLDmp1-53, cicavčí vektor expresie, produkujúci myšiu rozpustný MPL receptor typu I, bol skonštruovaný spojením segmentov pSLmp1-9 a pSLmp1-26 do vektora expresie pHZ-200 (pHZ-1, v ktorom je gén neomycínovej rezistencie nahradený dihydrofolát reduktázovou sekvenciou). 1164 bp *Eco* RI/*Bam* HI cDNA fragment z pSLmp1-9 nahradil cicavčiu signálnu sekvenciu deletovanú počas konštrukcie bakteriálneho plazmidu expresie pSLmp1-26. 416 bp *Bam* HI fragment z pSLmp1-26 dodal kódujúcu sekvenciu pre karboxy-koncovú časť rozpusteného MPL receptora, doménu pre označenie kinázou, polyhistidínový úsek a translačný terminátor. Tieto dva fragmenty boli čistené na géli a klonované do *Eco* RI/*Bam* HI miest pBluescript[®] KS+ (Stratagene Cloning Systems) za vzniku plazmidu pBS8.76LD-5. Správna orientácia 416 bp *Bam* HI fragmentu, odvodeného od pSLmp1-26 vzhľadom na 1164 bp *Eco* RI/*Bam* HI fragmentu, odvodeného od pSLmp1-9, bola v pBS8.76LD-5 stanovená pomocou PCR s použitím primerov ZC6603 (GAGGAATTCG CAGAAGCCAT GCCCTCTTGG GCCCTCTTCA TGGTC) a ZC6703 (CGACTTTACC TCGAGTGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC). Miesto *Xba* I vo vnútri polyspojčkovej sekvencie pBS8.76LD-5 umožňovalo vybratie rekonštituovanej receptorovej cDNA ako 1,5 kb *Eco* RI/*Xba* I fragmentu na klonovanie do pHZ-200 po digescii tohto vektora s *Eco* RI a *Xba* I. Výsledný cicavčí plazmid expresie, pLDmp1-53, bol pripravený vo veľkom meradle na

transfekciu do buniek BHK.

20 µg čisteného plazmidu pLDmpl-53 bolo transfekovaných do buniek BHK 570 s použitím kalciumfosfátovej precipitačnej metódy. Po 5 hodinách dostali bunky šok s 15 % glycerolom po 3 minúty na uľahčenie zachytenia DNA. Počas noci bolo pridané čerstvé rastové médium. Na nasledujúci deň boli bunky rozdelené do rôznych riedení a bolo pridané selekčné médium obsahujúce 1 µM metotrexátu. Asi po 2 týždňoch boli viditeľné jednotlivé metotrexát-rezistentné kolónie. Rezistentné kolónie buď boli spojené, alebo udržiavané ako oddelené klony. Použité médiá zo spojených kolónií boli okamžite testované na prítomnosť rozpustnej bielkoviny MPL receptora.

Rozpustná bielkovina MPL receptora bola izolovaná prostredníctvom interakcie polyhistidínového úseku, prítomného v karboxy-konca bielkoviny, s kovovo-chelatačnou živicom obsahujúcou imobilizovaný Ni^{2+} (HIS-BIND™, Novagen, Madison, WI). Bezsérové kultivačné médium použité v spojených kolóniách pLDmpl-53 sa nechalo pretiecť cez túto živicu a naviazaná bielkovina bola eluovaná 1M imidazolom. SDS-PAGE analýza ukázala jediný pruh pri -67 kDa. Táto bielkovina bola podrobená analýze N-koncových aminokyselín a bola potvrdená ako myší MPL receptor.

Rozpustná bielkovina MPL receptora bola čistená zo spojených BHK transfektantov, ktoré boli transfekované plazmidom pLDmpl-53, exprimujúcim myší rozpustný MPL receptor typu I. Tento čistený rozpustný receptor bol imobilizovaný na matrici CNBr-aktivovanej SEPHAROSE™ 4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.) v podstate tak, ako je doporučované výrobcom, a bol použitý na purifikáciu MPL aktivity v kondicionovaných médiách buniek 24-11-5. Afinitná matrica bola naložená do kolóny XK16 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.). Kondicionované médium z buniek 24-11-5 bolo skoncentrované na membráne dutých vlákien s hodnotou 10 kDa (A/G Technology Corp., Needham, MA) a nanesené zdola na MPL receptorovú afinitnú kolóniu pri prietoku 1 ml/min. Kolóna bola premytá soľným roztokom pufovaným fosfátom (PBS), obsahujúcim 0,5 M NaCl a 0,01 % azidu sodného. MPL aktivita bola

z kolóny eluovaná 3 M tiokyanátom draselným (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) pri prietoku 0,5 ml/min. Tiokyanát draselný bol odstránený dialýzou proti PBS. Aktívne frakcie boli identifikované pomocou MTT proliferačného testu (opísané v príklade 7).

Príklad 5

Izolácia a charakterizácia bunečnej línie exprimujúcej ligand MPL receptora

Bunky BaF3/MPLR1.1 sú IL-3 dependentné bunky, exprimujúce stabilne transfekovaný myšší MPL receptor typu I. Bola rozplánovaná mutagenéza a selekčné schéma na izoláciu bunečných línií exprimujúcich ligand MPL receptora použitím mutagenézy buniek BaF3/MPLR1.1 a selekcie na autokrinný rast v neprítomnosti exogenného IL-3.

Približne $1,2 \times 10^6$ buniek BaF3/MPLR1.1 bolo peletovaných a premytých GM (RPMI 1640 médium doplnené 2-merkaptóetanolom (finálna koncentrácia 1 : 280 000), 2 mM L-glutamínom, 110 µg/ml pyruvátu sodného, 50 µg/ml G418 a 10 % tepelne inaktivovaného fetálneho bovinného séra. Bunky boli resuspendované v 2 ml GM obsahujúceho 0,15 % (obj./obj.) mutagénu 2-etylmetansulfonátu (EMS) a inkubované 2 hodiny pri 37 °C. Po inkubácii boli bunky premyté raz v PBS a raz v GM a nanesené na 10 cm misky pri hustote asi 40 000 buniek/ml v GM doplnenom 5 % kondicionovaným médiom WEHI-3 buniek (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) ako zdroje IL-3. Pred selekciou na rast nezávislých buniek na IL-3 boli bunky vystavené inkubácii v priebehu 7 dní pri 37 °C pod 5 % CO₂. Po tomto období boli v kultúre husté životaschopné bunky. Bunky boli premyté GM a kultivované v GM bez WEHI-3 kondicionovaného média. Po 11 dňoch selekcie bol pozorovaný malý počet životaschopných buniek. Hustota životaschopných buniek na IL-3 nezávislej kultúry bola odhadnutá na 250 buniek/ml. Po 1 ml na IL-3 nezávislej kultúry bolo nanesených do 19 jamiek 24-jamkovej kultivačnej doštičky na ďalšiu charakterizáciu.

Kondicionované média vo vyššie opísanom raste buniek BaF3/MPLR1.1 nezávislého od IL-3 boli testované na aktivitu proliferácie na bunky BaF3/MPLR. V kondicionovaných médiách vo všetkých 19 vzorkách nezávislých čo do rastu na IL-3 bolo zistené, že majú aktivitu v MTT proliferáčnom teste (opísanom v príklade 7). Pozitívne média boli ďalej testované na proliferáčnú aktivitu v prítomnosti 2 µg/ml protilátok potkana oproti myšiemu IL-3, myšiemu IL-4 alebo v prítomnosti oboch neutralizujúcich protilátok (Pharmigen, San Diego, CA) na identifikáciu mutantov, ktorých rast bol nezávislý od IL-3 a ktoré exprimovali tieto cytokiníny. (V predchádzajúcom experimente bolo zistené, že bunky BaF3 odpovedali tiež na IL-4). Len v kondicionovanom médiu z buniek z doštičky č. 11 (označených ako bunky "24-11") bolo zistené, že má aktivitu, ktorá nebola neutralizovaná protilátkami na IL-3 alebo IL-4.

Vyššie uvedené schéma mutagenézy a selekcie sa aplikovalo na päť ďalších BaF3/MPLR klonov (BaF3/MPLR1 klony č. 4, 9, 12, 15 resp. 18. označované ako BaF3/MPLR1.4, .9, .12, .15 resp. ktoré stimulujú proliferáciu BaF3/MPLR1 buniek. Ďalej bolo zistené, že aktivita všetkých týchto médií je neutralizovaná protilátkami IL-3 alebo IL-4, jednotlivo alebo v kombinácii. Tieto klony neboli ďalej charakterizované.

Proliferačná aktivita kondicionovaných médií zo vzorky 24-11 bola podrobne charakterizovaná. Bola rozdelená na 19 menších vzoriek a kondicionované médiá boli re-testované na aktivitu. Všetkých 19 menších vzoriek (t.j. 24-11-1 až 24-11-19) stimulovalo v neprítomnosti exogenného IL-3 proliferáciu buniek BaF3/MPLR1, rastom závislých od IL-3. Táto aktivita nebola inhibovaná neutralizujúcimi protilátkami IL-3 alebo IL-4 alebo kombináciou obidvoch týchto protilátok.

Na stanovenie špecifickej 24-11 aktivity sa urobili dva pokusy. Kondicionované médiá boli testované na proliferáčnú aktivitu na kontrolných BaF3 bunkách, ktoré neexprimujú MPL receptor. V neprítomnosti exogenného IL-3 nebola proliferácia kontrolných BaF3 buniek pozorovaná so žiadnym z kondicionovaných

médií z 19 menších vzoriek 24-11. V druhom pokuse bola aktivita proliferácie testovaná na inhibíciu rozpustným MPL receptorom. Bunky BaF3/MPLR1 boli kultivované v GM doplnenom o 50 % kondicionovaného média 24-11. Ku vzorkám bol pridávaný myší rozpustný MPL receptor typu I na konečnú koncentráciu 0,0, 0,625, 1,25, 2,5 alebo 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky boli odčítané MTT testom bunečnej proliferácie po 4 dňoch. Proliferačná aktivita kondicionovaného média 24-11 bola úplne blokovaná pri 0,625 až 1,25 $\mu\text{g/ml}$ rozpustného MPL receptora. Koncentrácie rozpustného receptora, ktoré úplne inhibovali aktivitu, nemali žiadny vplyv na IL-3 alebo IL-4 stimuláciu BaF3/MPLR1 buniek. Tieto výsledky ukázali, že rozpustný MPL receptor kompetuje o stimulačnú aktivitu 24-11 médií a boli v súlade s hypotézou, že bunky 24-11 exprimujú ligand MPL receptora.

Klony odvodené od buniek 24-11 boli izolované nanosením limitujúcich riedení. Jeden klon, označený 24-11-5 #3, mal vo svojich kondicionovaných médiách vysokú hladinu proliferatívnej aktivity v relácii k celkovej vzorke 24-11. Bolo zistené, že proliferatívna aktivita je rovnaká ako pri riedení 1:2000 kondicionovaného média z WEHI-3 buniek (Becton Dickinson Labware).

Príklad 6

Konštrukcia knižnice cDNA 24-11-5 #3

Celková RNA sa pripravila z $-2,7 \times 10^8$ buniek 24-11-5 #3 s použitím guanidín isytiokzanátu s následnou CsCl centrifugáciou (Chirgwin et al., ibid), poly(A)⁺ RNA bola izolovaná s použitím izolačnej súpravy OLIGOTEX-dT-mRNA (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) podľa inštrukcií výrobcu.

Prvé vlákno cDNA z 24-11-5 #3 buniek sa syntetizovalo v 4 oddelených paralelných reakciách. Každá reakcia obsahovala 7 μl poly d(T)-selektovanej poly(A)⁺ RNA 24-11-5 #3 s koncentráciou 1,6 $\mu\text{g/ml}$ a 2,5 μl 20 pmol/ μl roztoku primeru prvého vlákna ZC6172 (GTCGGTGCTC AGCATTCACT ACTCGAGGGT TTTTTTTTTT TTTTTT),

obsahujúceho restriktčné miesto Xho I. Zmes bola zahrievaná na 65 °C 4 minúty a ochladená ľadom. Syntéza prvého vlákna cDNA bola začatá pridaním 8 µl pufru prvého vlákna (5x SUPERScript™ pufr, GIBCO BRL), 4 µl 100 mM ditiotritolu a 2 µl roztoku deoxynukleotid trifosfátov obsahujúceho po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-metyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) k zmesi RNA-primer. Reakčná zmes bola inkubovaná pri 45 °C 4 minúty s nasledovným pridaním 10 µl 200 U/µl roztoku RNázy H⁻ reverznej transkriptázy (GIBCO BRL). Účinnosť syntézy prvého vlákna bola analyzovaná v paralelnej reakcii pridaním 10 µCi ³²P-αdCTP k 10 µl alikvotu jednej z reakčných zmesí na značenie reakcie pre analýzu. Reakcie boli inkubované pri 45 °C 1 hodinu s následnou inkubáciou pri 50 °C 15 minút. Neinkorporovaný ³²P-αdCTP v značenej reakcii bol odstránený chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (Clontech Laboratories Inc.). Neznačené reakcie pre tvorbu prvého vlákna boli spojené a neinkorporované nukleotidy v reakcii neznačeného prvého vlákna boli odstránené dvojitým zrážaním cDNA v prítomnosti 32 µg glykogénového nosiča, 2,5 M octanu amonného a 2,5 objemu etanolu. Neznačená cDNA bola resuspendovaná v 144 µl vody na použitie pri syntéze druhého vlákna. Dĺžka značeného prvého vlákna cDNA bola stanovená elektroforézou v agarózovom géli.

Syntéza druhého vlákna bola uskutočnená na prvom vlákne cDNA v podmienkach, ktoré podporujú štartovanie syntézy druhého vlákna prvým vláknom s výslednou tvorbou DNA sľučiek. Urobili sa 3 oddelené paralelné reakcie pre syntézu druhého vlákna. Každá reakcia pre druhé vlákno obsahovala 48 µl cDNA neznačeného prvého vlákna, 16,5 µl vody, 20 µl 5 x pufru pre polymerázu I /100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 1 µl 100 mM ditiotritolu, 2 µl roztoku obsahujúceho po 10 mM koncentráciu všetkých deoxynukleotid trifosfátov, 3 µl 5 mM roztoku β-NAD, 15 µl 3U/µl roztoku E. coli DNA ligázy (New England Biolabs, Inc.) a 5 µl 10 U/µl roztoku E. coli DNA polymerázy I (Amersham Corp.). Reakcia prebiehala pri teplote miestnosti a bola inkubovaná 5 minút s nasledovným pridaním 1,5 µl 2U/µl roztoku RNázy H (GIBCO BRL). Na monitorovanie účinnosti

syntézy druhého vlákna bolo 10 μ l časti z jednej zmesi na syntézu druhého vlákna označených 10 μ Ci ^{32} P- α dCTP. Reakcie boli inkubované pri 15 °C po dve hodiny s nasledovnou inkubáciou 15 minút pri teplote miestnosti. Neinkorporovaný ^{32} P- α dCTP v značenej reakcii bol pred analýzou pomocou elektroforézy v agarózovom géli odstránený chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (Clontech Laboratories). Neznačené reakcie boli spojené a extrahované fenol/chloroformom a chloroformom s následnou etanolovým zrážaním v prítomnosti 2,5 M octanu amonného.

Jednovláknová DNA v štruktúre sľučky bola štiepená použitím rastlinnej ("mung bean") nukleázy. Reakčná zmes obsahovala 100 μ l cDNA druhého vlákna, 20 μ l 10x nukleázového pufru (Stratagene Cloning Systems), 16 μ g 100 mM dititritolu, 48 μ l vody a 10 μ l riediaceho "mung bean" nukleázového pufru a 6 μ l 50 U/ μ l "mung bean" nukleázy (Promega Corp.). Reakcia bola inkubovaná pri 37°C 30 minút a skončená pridaním 20 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8,0 s nasledovnou postupnou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom, ako je vyššie uvedené. Po extrakcii bola DNA zrážaná v etanole a resuspendovaná vo vode.

V resuspendovanej cDNA boli zatupené konce T4 DNA polymerázou. cDNA, ktorá bola resuspendovaná v 188 μ l vody, bola zmiešaná s 50 μ l 5x T4 DNA polymerázového pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM KCl, 25 mM $MgCl_2$), 3 μ l 0,1 M ditiotritolu, 4 μ l roztoku obsahujúceho po 10 mM koncentráciu všetkých deoxynukleotid trifosfátov, 5 μ l 1 U/ μ l roztoku T4 DNA polymerázy (Boehringer Mannheim Corp.). Po 30 minútovej inkubácii pri 15 °C bola reakcia ukončená pridaním 10 μ l 0,5 M EDTA s nasledujúcou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom tak, ako je to vyššie uvedené. DNA bola chromatografovaná cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 na odstránenie stopových množstiev bielkovín a na odstránenie krátkych cDNA s dĺžkou menšou ako -400 bp. cDNA bola zrážaná etanolom v prítomnosti 10 μ g glykogénového nosiča a 2,5 M octanu amonného a bola resuspendovaná v 15 μ l vody. Na základe inkorporácie ^{32} P- α dCTP bol výťažok cDNA určený ako -8 μ g z počiatočných 40

µg mRNA templátu.

Na 5' konce cDNA opísanej vyššie boli zaligované Eco RI adaptéry na umožnenie klonovania do vektora expresie. Na 10 µl časti cDNA (-5 µg) a 21 µl 65 pmol/µl roztoku Eco RI adaptéra (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) bolo zmiešaných so 4 µl 10x ligázového pufru (Promega Corp.), 3 µl 10 mM ATP a 3 µl 15 U/µl roztoku T4 DNA ligázy (Promega Corp.). Reakcia bola inkubovaná cez noc (48 hodín) pri 9 °C. Reakcia bola skončená pridaním 140 µl vody a 20 µl 10x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.) a inkubáciou pri 65 °C 40 minút. Po inkubácii bola cDNA extrahovaná fenol/chloroformom a chloroformom, ako je to opísané vyššie a precipitovaná v prítomnosti 2,5 M octanu amonného a 1,2 objemu izopropanolu. Po centrifugácii bola cDNA peleta vymývaná 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 89 µl vody.

Na zabezpečenie jednosmerného klonovania tejto cDNA do vektora expresie bola táto cDNA digeroaná Xho I, čo dalo cDNA majúcej 5' Eco RI lepivý koniec a 3' Xho I lepivý koniec. Restričné miesto Xho I na 3' konci cDNA bolo skôr zavedené s primerom ZC6172 (GAGCACAGAA TTCCTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT). Digestia restričným enzýmom bola uskutočnená v reakcii obsahujúcej 89 µl cDNA opísanej vyššie, 10 µl 10x H pufru (Promega Corp.) a 1,5 µl 40 U/µl Xho I (Boehringer Mannheim Corp.). Reakcia bola skončená seriálnou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom a chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400 (Clontech Laboratories Inc.).

cDNA bola vyzrážaná etanolom, premytá 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 20 µl 1x nakladacieho gélového pufru (10 mM Tris-HCl), pH 8,0, 1mM EDTA, 5 % glycerol a 0,125 % brómfenolovej modrej). Resuspendovaná cDNA bola zahriata na 65 °C 5 minút, ochladená na ľade a podrobená elektroforéze na 0,8 % géli nízкотopnej agarózy (SEA PLAQUE GTG™ nízкотopná agaróza, FMC Corp.). Kontaminujúce adaptéry a cDNA pod dĺžkou 0,5 Kb boli vyrezané z gélu. Elektródy boli

prehodené a cDNA bola podrobená elektroforéze, dokiaľ sa neskoncentrovala blízko začiatku dráhy. Oblasť obsahujúca skoncentrovanú cDNA bola vyrezaná a daná do mikrocentrifugačnej skúmavky a bol stanovený približný objem rezu gélu. Do skúmavky bola pridaná alikvótna časť vody, asi trojnásobok objemu rezu gélu (300 μ l) a agaróza bola roztavená zahriatím na 65 °C 15 minút. Po ekvilibracii vzorky na 42 °C bolo pridaných 5 μ l 1 U/ μ l β -agarázy (New England Biolabs, Inc.) a zmes bola inkubovaná 90 minút pri 45 °C na digestiu agarózy. Po inkubácii sa k vzorke pridalo 40 μ l 3 M octanu sodného a zmes bola inkubovaná na ľade 15 minút. Vzorka bola centrifugovaná pri 14000 $\times$ g 15 minút pri izbovej teplote na odstránenie nezdigerovanej agarózy s následnou chromatografiou cez gélovo-filtračnú kolónu s veľkosťou pórov 400. cDNA bola zrážaná etanolom premytá 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 70 μ l vody na kinázovú reakciu fosforylácie zaligovaných Eco RI adaptérov.

K 70 μ l roztoku cDNA sa pridalo 10 μ l 10 ligázového pufru a zmes bola zahrievaná na 65 °C 5 minút. Bola ochladená na ľade a pridalo sa 16 μ l 10 mM ATP a 4 μ l 10 U/ μ l T4 polynukleotid kinázy (Stratagene Cloning Systems). Reakcia bola inkubovaná pri 37 °C 1 hodinu a skončená zahrievaním na 65 °C 10 minút s nasledujúcou seriálnou extrakciou fenol/chloroformom a chloroformom. Fosforylovaná cDNA bola zrážaná etanolom v prítomnosti 2,5 M octanu amonného, premytá 70 %-ným etanolom, vysušená na vzduchu a resuspendovaná v 10 μ l vody. Koncentrácia fosforylovanej cDNA bola stanovená na -40 fmol/ μ l.

Cicavčí vektor expresie pDX (zverejnený v US patente č. 4 959 318) (obrázok) bol modifikovaný na zavedenie 24-11-5 #3 cDNA, ktorá bola syntetizovaná s Eco RI a Xho I koncami. Endogénne Sal I miesto na pDX bolo zrušené digestiou plazmidu s Sal I T4 DNA polymerázou. Recirkulovaný plazmid bol digerovaný Eco RI a k nemu bola pridaná zaligovaná krátka sekvencia poly-spojky, pozostávajúca z dvoch komplementárnych oligonukleotidov, ZC6936 (AATTGGCGGC CGCGTCGACT CGTGGAITG) a ZC6937 (AATTCATCCA CGAGTCGACG CGGCCGCC) za vzniku plazmidu

pDX.ES. Zavedená sekvencia poly-spojky na pDX.ES obsahovala EcoRI a Sal I miesta na uabezpečenie jednosmerného klonovania 24-11-5 cDNA, syntetizovanej s Eco RI a Xho I koncami.

Plazmidová cDNA knižnica bola pripravená ligáciou EcoRI-Xho I 24-11-5 cDNA do Eco RI/Sal I digerovaného pDX.ES. Ligačná zmes bola elektroporovaná do *E. coli* (kompetentné bunky ELEKTROMAX™ DH10B™; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) spoužitím pulzačného prístroja 0,2 cm kvety s nastavením 0,2 KV, 400 ohm a 25 μ FAD. Bunky boli zriedené v 1,5 ml Luriovej pôdy a inkubované pri 37 °C 45 minút s nasledujúcim pridaním 0,75 ml 50 % glycerolu. Transfekované bunky boli rozdelené na príslušné časti a skladované pri -70 °C do doby použitia. Z 80 fmolov cDNA vzniklo viac ako 700 000 nezávislých rekombinantných plazmidov.

Príklad 7

Hodnotenie exprese v 24-11-5 cDNA knižnici na MPL aktivitu

24-11-5 #3 cDNA knižnica bola nanosená na asi dvetisíc miesiek s priemerom 10 cm s Luriovým živným agarom doplneným o 100 μ g/ml ampicilínu. Hustota nanášania bola medzi 200 a 250 bakteriálnymi kolóniami na misky. Plazmidová DNA na transfekciu do buniek BHK 570 sa pripravila z každej bakteriálnej misky s použitím DNA purifikačnej živice MAGIC MINIPREPST™ (Promega Corp.) podľa inštrukcií výrobcu. Plazmidové DNA boli skladované pri -20 °C do doby transfekcie BHK 570 buniek.

Vzorky plazmidov 24-11-5 #3 cDNA, každá obsahujúca asi 200 až 250 cDNA klonov, boli transfekované do buniek BHK 570 s použitím 3 : 1 lipozómového prípravku z 2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminkarboxyamido)etyl]-N,N-dimetyl-1-propanamínium tri-fluoracetátu a diolelylfosfatidyletanolamínu vo vode (LIPOFECTA-MINET™, Gibco BRL). 20 μ l 30 ng/ml DNA bolo pridaných k 20 μ l 1 : 10 zriedeného roztoku LIPOFECTAMINET™ a inkubovaných pri izbovej teplote 30 minút. Po inkubácii sa k zmesi DNA/LIPOFECTA-MINET™ pridalo 160 μ l bezsérového média (Hams F12 : Dulbeccovo NEM (1 : 1), doplnené o 2 mM L-glutamínu, 110 μ g/ml pyruvátu

sodného, 5 µg/ml inzulínu, 5 µg/ml fetuínu, 10 µg/ml transferínu 2 ng/ml oxidu seleničitého a 25 mM HEPES pufru) a zmes sa preniesla do 24 jamkovej mikrotitačnej doštičky obsahujúcej -100 000 buniek BHK 570. Bunky boli inkubované pri teplote 37 °C pod 5 % CO₂ 4 hodiny a potom bolo pridaných 200 µl BHK rastového média (Dulbeccovo modifikované Englesovo médium doplnené o 2 mM L-glutamínu, 0,11 mg/ml pyruvátu sodného, 5 % tepelne inaktivovaného fetálneho teľacieho séra a 100x PSN antibiotika (GIBCO BRL). Bunky sa inkubovali 16 hodín. Média boli odstránené a nahradené 0,5 ml čerstvého BHK rastového média, ktoré sa pred testovaním na MPL aktivitu kondicionovalo 48 hodín.

Na detekciu prítomnosti MPL aktivity v kondicionovaných médiách buniek BHK 570 transfekovaných knižnicou sa použil test bunečnej proliferácie. 100 µl kondicionovaného média sa pridalo k 100 µl 10⁶/ml premytých buniek BaF3/MPLR1.1 v RPMT médiu JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) doplnenom o 2 mM L-glutamínu a PSN antibiotika (GIBCO BRL), 0,00036 % 2-merakptoetanolu a 10 % tepelne inaktivovaného fetálneho teľacieho séra. Pred testovaním na proliferáciu boli bunky inkubované 3 dni pri teplote 37 °C pod 5 % CO₂.

Proliferácia buniek v prítomnosti MPL bola kvantifikovaná použitím kolorimetrického testu založeného na metabolickom rozklade 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) (Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63, 1983). 20 µl 10 mg/ml roztoku MTT (Polyscience, Inc., Warrington, PA) bolo pridaných k 100 µl testovaných buniek BaF3/MPLR1.1 a bunky sa pri teplote 37 °C inkubovali. Po 4 hodinách bolo pridaných 200 µl 0,04 N HCl v izopropanole, roztok sa premiešal a absorbanca vzorky sa zmerala pri 57 nM na ELISA čítačke model EL320 (Bio-Tek Instruments Inc., Highland Park, VT).

Do buniek BHK 570 bola transfekovaná jedna vzorka spojených plazmidov, ktorá bola pozitívna a označená T1081. Supernatanty týchto transfektantov dávali pozitívny signál v MTT proliferáčnom teste. PCR a pokusy s neutralizáciou protilátkami ukázali, že táto aktivita nebola spôsobená IL-3 alebo IL-4.

Plazmidy tejto pozitívnej vzorky sa použili na transformáciu *E. coli* DH10B a bunky sa naniesli na misky (42 misiek s približne 15 až 20 kolóniami na miskú, 10 misiek s asi 90 kolóniami na miskú a 8 misiek s asi 250 kolóniami na miskú). Boli pripravené kópie všetkých misiek, ktoré boli pri teplote 4 °C uložené. Kolónie originálnych misiek boli zoškrabnuté a nechali sa narásť v tekutej kultúre ešte niekoľko hodín a potom bola pripravená DNA.

Plazmidová DNA z týchto menších vzoriek bola transfekovaná do buniek BHK 570 a bunkové supernatanty boli odobraté a testované ako je uvedené vyššie. Po asi 2 hodinách bola jedna vzorka (#22) vyhodnotená ako pozitívna mikroskopickým prehliadaním (predĺžený tvar buniek). O niekoľko hodín neskôr boli dve ďalšie vzorky (#19 a #28) tiež vyhodnotené ako pozitívne. Zvyšné supernatanty z každej pozitívnej vzorky boli testované s kontrolnými BaF3 bunkami a nebola v nich zistená žiadna aktivita. Navyše: Pri aktivite z týchto troch pozitívnych vzoriek bolo zistené, že je inhibovaná rozpustným receptorom typu I.

Misky s kópiami z troch pozitívnych vzoriek sa nechali rásť niekoľko hodín, potom boli jednotlivé kolónie vypichnuté a použité na inokuláciu 3 ml kultúr. Kultúry sa pri teplote 37 °C rozrastali asi 8 hodín, potom sa pripravila DNA "miniprepovým" spôsobom opísaným vyššie. Plazmidová DNA bola transfekovaná do buniek BHK 570 a bunkové supernatanty boli asi po 10 hodinách odobraté a testované na aktivitu. Jeden klon (označený T1081-19-215 a odpovedajúci vzorke #19) bol hodnotený po hodine ako pozitívny. Tento klon bol znova nanosený na získanie jednotlivých kolónií. Z 12 kolónií bola pripravená DNA a transfekovaná do buniek BHK 570. Všetkých 12 transfektantov bolo neskôr potvrdených ako pozitívne. DNA jednej z 12 pozitívnych kolónií bola transformovaná do *E. coli* DHP α . Tento plazmid bol označený pZGmp1-1081. Tento transformant bol uložený 14. februára 1994 v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD pod prístupovým číslom 69566.

Bola stanovená nukleotidová sekvencia cDNA kódujúca hematopoetickú bielkovinu (trombopoietin) (vzorec III). Analýza kódovanej aminokyselinovej sekvencie (vzorec I) ukázala, že amino-koniec zrelej bielkoviny je v aminokyselinovom zvyšku 45. Dva metionínové kodóny v pozíciách 105 a 174 vo vzorci III sa zdajú byť iniciačnými kodónmi s hlavným miestom iniciácie očakávaným v pozícii 174.

Príklad 8

Hematopoetická aktivita rekombinantného trombopoietinu

Zo stehnových kostí a píštal samičích CD-1 post-pregnantných myší bola odobratá dreň do 25 ml CATCH pufru (99 mg teofylínu, 0,75 g citrátu sodného, 75 mg adenosínu, 20 ml 10x Kankovho vyváženého soľného roztoku bez Ca^{++} a Mg^{++} na 200 ml v dH_2O ; pH 7,4). Bunky boli suspendované na suspenziu jednotlivých buniek pipetovaním 25 ml pipetou. Objem bol nastavený CATCH pufrom na 50 ml a bunky boli peletované pri 1 000 rpm 7 minút. Peleta bola resuspendovaná v 25 ml CATCH pufru a inkubovaná v T75 fľašiach pre tkanivové kultúry na prvé kolo adhézie k plastu po 2 hodiny pri teplote 37 °C. Neaderované bunky boli odobraté a centrifugované pri 1 000 rpm 7 minút na speletovanie buniek. Peleta bola resuspendovaná v 15 ml α -NEM + 10 % FBS (+ L-glutamín, Na-pyruvát a PSN antibiotikum) a inkubovaná v T75 fľašiach pre tkanivové kultúry na druhé kolo adhézie k plastu, ako je to uvedené vyššie pre prvé kolo. Po finálnej centrifugácii a resuspendovaní boli bunky počítané. Jedna polovina buniek s 576 000 bunkami/ml bola nanesená do 24-jamkových kultivačných doštičiek spolu so vzorkou média z kontrolných BHK buniek alebo s kondicionovaným médiom z BHK buniek transfekovaných pZGmp1-1081. Po 3 dňoch inkubácie pri teplote 37 °C boli bunky odobraté a farbené ako je opísané vyššie.

Z kontrolnej jamky so štandardným kondicionovaným médiom sa odobralo 150 μl buniek. Z jamiek s kondicionovaným médiom z BHK buniek transfekovaných pZGmp1-1081 sa vzalo 50 μl buniek. Tieto

vzorky boli stočené a boli pripravené štandardné mikroskopické preparáty.

Preparáty boli fixované v 100 %-nom metanole, potom premývané : 1 Wrightovým roztokom (0,5 g Wrightovho farbiva v 300 ml metanolu) vo vode 6 minút, premyté vodou a vysušené. Preparáty potom boli premývané vo farbive Giemsa (Sigma Chemical Corp.) v Sorensonovom pufri (2,28 g KH_2PO_4 / 2,38 g NaPO_4 v 250 ml H_2O), premývané vodou a vysušené.

Vzhľadom na použité objemy vzorka s médiom BHK/pZGmp1-1081 obsahovala 120 megakaryocytov na 150 μl objem v porovnaní s 9 megakaryocytmi na 150 μl objem v kontrolnom médiu. Navyše vo vzorke megakaryocytov bolo mikroskopicky pozorované, že sú rozmerovo významne väčšie a že majú značne vyššie farbenie na polynukleárny obsah.

Kondicionované médiá z mutantnej línie BaF3/MPLR1.1 24-11-5 #3 boli odoberaté a skoncentrované 20-krát na filtračno zariadení Amicon Inc. s hodnotou 10 kDa (Beverly, MA). Vzala sa dreň z myších stehnových kostí a suspendovala sa v Iscoveovom modifikovanom Dulbeccovom médiu (GIBCO BRL) + 15 % fetálneho telacieho séra (FCS). Po suspendovaní boli bunky s jadrami spočítané a nanesené s 0,9 ml/misku pri 75 000 buniek/ml v médiu nastavenom tak, aby obsahovalo 50 % metylcelulózy, 15 % FCS, 10 % BSA a 0,6 % PSN (polotuhé médium) na 1-ml misky pre tkanivové kultúry. Boli pridané rôzne kondicionované médiá a kontrolné vzorky tak, aby celkový objem dosiahol 1 ml. Misky sa inkubovali pri teplote 37 °C pod 5 % CO_2 6 dní a potom sa prezerali mikroskopicky na stanovenie počtu kolónií granulocytov/makrofágov (GM). V miskách inkubovaných v prítomnosti kondicionovaného média 24-11-5 #3 bolo pozorované, že majú slabú aktivitu podobnú GM-CSF, produkujúcu počet kolónií 25 v porovnaní s nulovým počtom pre vzorky negatívnej kontroly a počtom 130 pre misku stimulovanú s pozitívnou kontrolou (kondicionované médium sleziny stimulované repkovým mitogénom (PWMSM), pripravené inkubáciou rozdrvenej myšej sleziny jeden týždeň v prítomnosti repkového mitogénu (získaného od Boehringer

Mannheim, Indianapolis, IN) + 2 jednotky/ml erythropoietinu).

Bola odobratá dreň z myších stehnových kostí a suspendovala sa v Iscovovom modifikovanom Dulbeccovom médiu (GIBCO BRL) obsahujúcom 15 % FCS, bunky s jadrami boli spočítané a nanesené na polotuhé médium ako je opísané vyššie. Tieto bunky sa používali na testovanie aktivity bielkoviny kódovanej inzertom pZGmp1-1081 pri tvorbe kolónií megakaryocytov.

Populácia buniek v BHK 570 stabilne transfekovaných pZGmp1-1081 sa kultivovala v neprítomnosti séra a zbieralo sa kondicionované médium. Toto kondicionované médium sa testovalo ako také a v kombinácii s kondicionovaným médiom sleziny a repkového mitogénu, rekombinantnom myšom IL-3, IL-6 (Genzyme Corp., Cambridge, MA), IL-11 (Genzyme Corp.) alebo s kombináciami týchto faktorov. PWMSCM sa používalo ako pozitívna kontrola. Ako negatívna kontrola sa používalo nekondicionované kultivačné médium.

Testované alebo kontrolné vzorky sa ku kultúram drene pridávali tak, aby konečný objem bol 1 ml. Misky sa inkubovali pri teplote 37 °C v 5 % CO₂ 6 dní a potom sa prezerali mikroskopicky na stanovenie počtu kolónií megakaryocytov. Výsledky sú uvedené v tabuľke 4. Súhrnne : Kondicionované médium BHK/pZGmp1-1081 vykazovalo aktivitu podporujúcu tvorbu kolónií megakaryocytov, ktorá bola zosilňovaná v prítomnosti rýchlo pôsobiacich faktorov na hladiny značne vyššie ako hladiny dosahované s ktorýmkoľvek rýchlo pôsobiacim faktorom samotným.

Tabuľka 4

Vzorka	Kolónií megakaryocytov
Negatívna kontrola	0
PWMSM	7
BHK/pZGmp1-1081	2
BHK/pZGmp1-1081 + PWMSM	15
IL-3	1
IL-3 + BHK/pZGmp1-1081	8
IL-6	0
IL-6 + BHK/pZGmp1-1081	6
IL-11	1
IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	6
IL-3 + IL-6	2
IL-3 + IL-6 + BHK/pZGmp1-1081	9
IL-3 + IL-11	5
IL-3 + IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	15

In vivo aktivita kondicionovaného média BHK/pZGmp1-1081 bola testovaná na myšiach. Bezsérové sérum bolo odobraté a skoncentrované 5-krát filtračným zariadením s hodnotou 10 kDa (Amicon Inc., Beverly, MA). Kontrolné (nekondicionované) médium bolo skoncentrované podobným spôsobom. 6 myšiam BALB/c (Simonsen Laboratories, Inc., Gilroy, CA) sa denne intraperitoneálne podalo 7 injekcií 0,5 ml buď kontrolného alebo kondicionovaného média. Vzorky krvi boli odoberané na deň 0, 3 a 7 a bol v nich spočítaný obsah doštičiek. Výsledky uvedené v tabuľke 5 ukazujú, že kondicionované médium z buniek BHK/pZGmp1-1081 má trombopoietickú aktivitu.

Tabuľka 5

Pôsobenie	Počet doštičiek ($10^4/\mu\text{l}$)		
	deň 0	deň 3	deň 7
kontrola	141	141	87
kontrola	159	149	184
BHK/pZGmp1-1081	157	160	563
BHK/pZGmp1-1081	169	154	669
BHK/pZGmp1-1081	139	136	492
BHK/pZGmp1-1081	135	187	554

Príklad 9

Izolácia ľudského trombopoietinového génu

Amplifikovaná Lambda FIX[®] genomická knižnica ľudských plúc (Stratagene Cloning Systems) bola preberaná na nájdenie génu kódujúceho ľudský trombopoietin s použitím myšieho cDNA ligandu MPL receptora ako sondy. Knižnica bola stitovaná a 30 150-mm misiek s inokulovanými bunkami *E. coli* kmeňa LE-392 (Stratagene Cloning Systems) bolo infikovaných s 4×10^4 jednotiek tvorby plakov (PFU). Misky boli inkubované cez noc pri teplote 37 °C. Vybratie plakov na filtre sa uskutočnilo pomocou HYBOND-NTM membrán (Amersham) podľa postupu doporučeného výrobcom. Filtre boli spracované denaturáciou v roztoku obsahujúcom 1,5 M NaCl a 0,5 M NaOH 7 minút pri izbovej teplote. Filtre boli krátko odsaté filtračným papierom na odstránenie prebytku denaturačného roztoku, potom nasledovala neutralizácia 5 minút v 1 M Tris-HCl, pH 7,5 a 1,5 M NaCl. Fágová DNA bola fixovaná na filtre s 1 200 μJ (Joule) UV energie v prístroji STRATALINKER[®] UV crosslinker (Stratagene Cloning Systems). Po fixácii sa filtre predmyli trikrát v 0,25 x SSC, 0,25 % SDS a 1 mM EDTA pri teplote 65 °C. Po predmytí boli filtre prehybridizované v hybridizačnom roztoku (5x SSC, 5x Denhardtov roztok, 0,1 % SDS, 1mM EDTA), ktorý bol

sfiltrovaný cez 0,45 μ m filter. Tepelne denaturovaná DNA lososieho spermatu (konečná koncentrácia 100 μ g/ml) bola pridaná tesne pred použitím. DNA filtre sa prehybridizovali cez noc pri teplote 65 °C.

TPO cDNA s plnou dĺžkou z pZGmp1-1081 bola označená ^{32} P pomocou štartovania náhodnými primermi použitím systému MEGAPRIMETM DNA Labelling System (Amersham). Prehybridizačný roztok bol odstránený a nahradený čerstvým hybridizačným roztokom obsahujúcim približne 1×10^6 cpm sondy a hybridizácia sa uskutočňovala cez noc pri teplote 65 °C. Po hybridizácii bol hybridizačný roztok odstránený a každý filter bol štyri alebo päťkrát ponorený do premývacieho roztoku obsahujúceho 0,25 x SSC, 1 mM EDTA. Po ponoreniach boli filtre premyté osemkrát po sebe nasledujúcimi premytiami v premývacom roztoku pri teplote 55 °C. Po poslednom premývaní boli filtre exponované na autorádiografický film (XAR-5, Eastman Kodak Co., Rochester, NY) s intenzifikačnou fóliou 4 dni pri -70 °C.

Prehliadka autorádiogramov odhalila niekoľko sto miest, ktoré hybridizovali so značenou sondou. Zo 100 miest boli vypichnuté agarové valčeky a ponorené do SM obsahujúceho 1 % (obj./obj.) chloroformu (Maniatis et al., vyd., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1982). Po inkubácii cez noc boli fágy z každého agarového valčeka zriedené 1 : 1 000 v SM. Alikvóty 5 μ l boli nanášané na bunky *E. coli* kmeňa LE-392. Misky boli inkubované cez noc pri 37 °C a vybratie plakov na filtre, prehybridizácia, hybridizácia, premývanie a autorádiografia sa vykonali vyššie uvedeným postupom.

Prehliadka výsledných autorádiogramov odhalila silné pozitívne signály v dvoch primárnych izolátoch a slabé signály v osemnástich ďalších. Z pozitívnych oblastí všetkých dvadsiatich signálov boli vypichnuté agarové valčeky, ktoré boli spracované vyššie uvedeným postupom. Fágy z každého agarového valčeka boli zriedené 1 : 100 v SM a alikvóty 1 μ l boli nanášané na bunky *E. coli* kmeňa LE-392. Misky boli inkubované a vybratie plakov a hybridizácia sa uskutočnili vyššie uvedeným postupom. Filtre sa

premývali v premývacom pufri pri teplote 55 °C. Autorádiogramy týchto filtrov odhalili miesta hybridizácie odpovedajúce jednotlivým, oddeleným fágovým plakom v troch pôvodných izolátoch, 8-3-2, 10-1-1 a 29-2-1.

Fágové izoláty 8-3-2, 10-1-1 resp. 29-2-1 boli označené ako λ ZGmp1-H8, λ ZGmp1-10 resp. λ ZGmp1-H29. DNA z izolátov λ ZGmp1-H8, λ ZGmp1-H10 a λ ZGmp1-H29 bola čistená použitím fágového adsorbenta LAMBDA SORB™ (Promega Corp., Madison, WI) podľa návodu výrobcu. Inzerty ľudskej genomickej DNA vo fágu boli od fágovej vektorovej DNA separované digesciou Xba I a vyčistené gélovou elektroforézou. Všetky tri fágové izoláty obsahovali sekvencie, ktoré hybridizovali so sondou myšieho cDNA ligandu *mpl* receptora, ako to ukázala Southernova analýza (Maniatis et al., ibid.). Bol analyzovaný fág λ ZGmp1-H8 a pre hybridizujúcu oblasť λ ZGmp1-H8 bolo zistené, že je umiestnená v troch Xba I DNA fragmentoch s dĺžkou 9,5 kb, 2,5 kb a 1 kb. Fragment 2,5 kb dĺžky bol subklonovaný do Xba I digerovaného fagemidu BLUESCRIPT® II Sk+ (Stratagene Cloning Systems) za vzniku plazmidu pZGmp1-H82.5.

Príklad 10

Izolácia cDNA ľudskeho trombopoietínu celej dĺžky

cDNA celej dĺžky, kódujúca ľudský TPO, bola izolovaná polymerázovou reťazovou reakciou z templátovej cDNA ľudskej pečene a ľadvín s použitím špecifických primerov odvodených od exonových sekvencií identifikovaných v pZGmp1-H82.5 a od konzervovanej 5' neprekladanej sekvencie myšej TPO cDNA.

Na syntézu prvého vlákna sa použili poly d(T)-selektované poly(A)+ RNA ľudských ľadvín, pečene a pľúc (Clontech, Palo Alto, CA). každá reakcia sa pripravila s použitím 4 μ g poly(A)+RNA zmiešaných s 1 μ g oligo d(T)₁₈ (bez 5' fosfátov) mRNA primeru (New England Biolab, Beverly, MA) v celkovom objeme 19 μ l. Zmesi boli zahrievané na 65 °C 5 minút a ochladené chladením na ľade. Syntéza cDNA bola zahájená pridaním 8 μ l 5x

SUPERSCRIPT™ pufru (Gibco BRL), 2 µl 100 mM ditiotritolu, 2 µl roztoku deoxynukleotid trifosfátov obsahujúceho po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ), 2 µCi 1 µCi/µl ³²P-αdCTP (Amersham, Arlington Heights, IL) a 8 µl 200 jednotiek/µl SUPERSCRIPT™ reverznou transkriptázou (Gibco BRL) ku každej zmesi RNA-primer. Reakcie boli inkubované pri 45 °C 1 hodinu a boli zriedené na 120 µl pomocou TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). cDNA boli dvakrát zrážané pridaním 50 µl 8 M octanu amonného a 160 µl izopropanolu. Výsledné cDNA pelety boli resuspendované v 10 µl TE. Výťažok cDNA prvého vlákna bol pre každú reakciu stanovený z hladiny inkorporácie ³²P-αdCTP.

cDNA prvého vlákna z pečenej, pľúcnej a ľadvinovej mRNA bola použitá na generovanie dvoch segmentov cDNA, N-koncovej tretiny a C-koncových dvoch tretín sekvencie, za použitia oddelených polymerázových reťazových reakcií. Do cDNA segmentov bolo zavedené Kpn I restričné miesto pomocou zámény jedinej bázy genomickej sekvencie s použitím PCR mutagenézy využívajúcej primery ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) a ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC). Výsledná nukleotidová zámena vytvorila spoločné Kpn I restričné miesto bez zmeny v predikovanom kódovaní aminokyselín.

N-koncový segment bol amplifikovaný v 50 µl reakcii obsahujúcej 5 ng templátovej cDNA (v oddelených reakciách pre cDNA ľadvín, pečene a pľúc), po 80 pmóloch oboch oligonukleotidov ZC7424 (TTAGACACCT GGCCAGAATG) a ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT), 5 µl 2,5 mM roztoku deoxynukleotid trifosfátov (Cetus Corp., Emeryville, CA), 5 µl 10 x CPR pufru (Promega Corp., Madison, WI) a 2,5 jednotky Tag polymerázy (Boehringer Mannheim). Reťazová reakcia prebiehala po 35 cyklov (1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 58 °C a 1,5 minúty pri 72 °C) s nasledujúcou 10 minútovou inkubáciou pri 72 °C. Primer vnemu ZC7424 (TTAGACACCT GGCCAGAATG) pokrýval 5' neprekladanú sekvenciu myšieho ligandu *mpl* receptora a zahrňoval iniciačný kodón ATG. Primer protivnemu ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) zahrňoval sekvencie z oblastí odpovedajúcich

exonom 4 a 5 ľudskej genomickej TPO DNA.

C-koncový segment bol amplifikovaný v 50 µl reakcii obsahujúcej 5 ng templátovej cDNA (ľudských ľadvín, pečene alebo pľúc, ako je to vyššie opísané), po 80 pmóloch oboch nukleotidov ZV7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC) a ZC7421 (TGATGTCGGC AGTGTCTGAG AACC), 5 µl 2,5 mM roztoku deoxynukleotid trifosfátov (Cetus Corp.), 5 µl 10 x CPR pufru a 2,5 jednotky Tag polymerázy (Boehringer Mannheim). Retazová reakcia prebiehala po 35 cyklov (1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 65 °C a 1,5 minúty pri 72 °C) s nasledujúcou 7 minútovou inkubáciou pri 72 °C. Primer vnemu ZC7423 pokrýval 5' neprekladanú sekvenciu myšieho ligandu *mpl* receptora a zahrňoval iniciačný kodón ATG. Primer protivnemu ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) zahrňoval sekvencie z oblastí odpovedajúcich exonom 4 a 5 ľudskej genomickej TPO DNA. Primer protivnemu ZC7421 (TGATGTCGGC AGTGTCTGAG AACC) zahrňoval sekvenciu z oblasti odpovedajúcej 3' nekódujúcej sekvencie ľudského génu a obsahoval translačný terminálny kodón.

Amplifikované produkty PCR boli analyzované priamym sekvenovaním DNA a subklonované do pGEM-T (Promega Corp.) na ďalšiu analýzu porovnávaním s myšou cDNA sekvenciou a ľudskými genomickými sekvenciami. DNA sekvencia kódujúca ľudský TPO je ukázaná vo vzorci IV a kódovaná aminokyselinová sekvencia je ukázaná vo vzorci II. Sekvenčná analýza ukazuje, že miesto odštiepenia signálneho peptidu sa nachádza v aminokyseline 22 (vzorec II) a že zrelá bielkovina začína v aminokyseline 22.

Ľudské N-terminálne a C-terminálne PCR fragmenty boli vybraté z pGEM-T ako EcoRI-KpnI fragmenty a zaligované do EcoRI miesta vektoru expresie Zem229R. Tento plazmid bol transfektovaný do buniek BHK 570 s použitím Lipofectamine™ (Gibco BTL). 24 hodín po transfekcii bolo kultivačné médium (DMEM + PSN + 10 % FCS) nahradené čerstvým médiom a bunky boli inkubované 48 hodín bez selekčných činidiel. Kondicionované médiá boli testované na proliferačnú aktivitu s použitím buniek BaF3/MPLR1.1 tak, ako to bolo už vyššie opísané. Výsledky jasne ukázali, že ľudský TPO v kultivačnom médiu stimuluje

proliferáciu buniek BaF3 exprimujúcich myšľ MPL receptor.

cDNA bola pripravená jednak z ľudskej pečenej, tak aj z ľudskej ľadvinej mRNA (získaných z Clontech Laboratories, Inc.) s použitím SUPERSRIPT™ reverznej transkriptázy. Klony ľudskej TPO DNA odvodené z pečene a ľadvín boli potom pripravené s použitím dvoch PCR reakcií (podmienky ukázané v tabuľke 6). Reakcie prebiehali v 35 cykloch 1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 58 °C a 1,5 minúty pri 72 °C s nasledujúcou 7 minútovou inkubáciou pri 72 °C.

Tabuľka 6

Reakcia č. 1

5 ng	cDNA pečene alebo ľadvín
4 µl	oligonukleotidu ZC7454 (CCGGAATTCT TAGACACCTG GCCAGAATG) (20 pM/µl), zavádza EcoRI miesto 5' od ATG
4 µl	oligonukleotidu ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) (20 pM/µl), vytvára Asp718 miesto
5 µl	dNTP roztoku obsahujúceho 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP a 2,5 mM dTTP
5 µl	10 x Taq pufru (Boehringer Mannheim)
1 µl	Taq polymerázy (Boehringer Mannheim)
30 µl	vody

Reakcia č. 2

5 ng	cDNA pečene alebo ľadvín
4 µl	oligonukleotidu ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC) (20 pM/µl), vytvára Asp718 miesto
4 µl	oligonukleotidu ZC7453 (CCGGAATTCT GATGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC) (20 pM/µl), zavádza EcoRI miesto 3' od TGA
5 µl	dNTP roztoku obsahujúceho 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP a 2,5 mM dTTP
5 µl	10 x Taq pufru (Boehringer Mannheim)
1 µl	Taq polymerázy (Boehringer Mannheim)
30 µl	vody

Produkty PCR boli spracované fenolom/chloroformom/izoamyl-alkoholom a vyzrážané 95 % EtOH, vysušené a resuspendované v 20 µl vody. každý produkt bol potom štiepený restriktčnými enzýmami Asp718 a EcoRI a podrobený elektroforéze v géli 1 % agarózy. 410 bp fragmenty (pečeň a ľadviny) z reakcie č. 1 a 699 bp fragmenty (pečeň a ľadviny) z reakcie č. 2 boli vyrezané z gélu a eluované z rezov gélu centrifugáciou cez nylonovú vatú.

PCR produkty reakcie č. 1 a reakcie č. 2 boli zaligované spolu s vektorom Zem229R (uloženým v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 28. september 1993 pod prístupovým číslom 69447), ktorý bol otvorený EcoRI, za spojenia týchto dvoch produktov vo vytvorenom Asp718 mieste. Výsledné plazmidy boli označené #10 (obsahuje cDNA odvodenú z ľadvín) a #29 (obsahuje cDNA odvodenú z pečene).

Pri sekvenovaní týchto DNA bola nájdená jediná PCR-generovaná chyba 5' resp. 3' od unikátneho AvrII miesta plazmidov #28 resp. #10. Na vytvorenie bezchybnej TPO DNA bol izolovaný 826 bp EcoRI-AvrII 5' fragment z plazmidu #10 a 283 bp AvrII-EcoRI 3' fragment z plazmidu #28. Tieto dva fragmenty boli zaligované spolu s vektorom Zem229R, ktorý bol otvorený EcoRI. Tento plazmid bol uložený v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 4. mája 1994 ako *E. coli* DH10b transformant pod prístupovým číslom 69615.

Príklad 11

Knižnica cDNA megakaryocytov

Na amplifikáciu prekursorov megakaryocytov *in vivo* bolo 20 myšiam denne intraperitoneálne injektovaných 40 000 aktívnych jednotiek (jednotky sú definované tak, že 50 jednotiek/ml je potrebných pri bunkách BaF3/MPLR1.1 v MTT teste (príklad 7) na získanie proliferatívnej rýchlosti rovnajúcej sa polovici maximálnej) rekombinantného myšieho trombopoietínu (koncentrovaného bezsérového kondicionovaného média z buniek BHK 570 stabilne transfekovaných myšou trombopoietínovou cDNA). Na

piaty deň boli injekciou vybrané sleziny a boli vložené do CATCH pufru + HEPES (10x Hankov vyvážený soľný roztok bez vápnika a horčíka, 10 mM HEPES (GIBCO BRL), 1,4 mM adenosín, 2,74 mM teofylín (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) a 0,38 % citrát sodný, pH nastavené hydroxidom sodným na 7,40). Sleziny boli spracované po piatich tak, že na každej sa urobili rezy a bunky z nich boli vytlačené medzi dvomi nerezovými sieťkami do CATCH pufru + HEPES. Po rozvoľnení určitých chuchvalcov buniek 25 ml pipetou bol objem zvýšený na 50 ml a bunky boli odcentrifugované pri 208 x g v čase 7 minút v centrifúge Sorval TJ-7. Každá bunečná paleta bola resuspendovaná v 10 ml CATCH pufru + HEPES a filtrovaná cez 130 µm nylonovú sieťku na získanie suspenzie jednotlivých buniek. Objemy boli zvýšené na 50 ml CATCH pufrom + HEPES a bunky boli odcentrifugované pri 33 x g 10 minút. Bunečné pelety boli resuspendované v 10 ml CATCH pufru + HEPES a navrstvené na trojstupňový gradient Percollu (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Švédsko) (gradient 65, 40 a 27 % v 1 % CATCH pufru + HEPES, 12 ml každého v 50 ml centrifugačnej kyvete) a centrifugované pri 833 x g 45 minút. Bunky boli odobraté medzi vrstvami 40 a 5 % percollu a objemy boli zvýšené na 50 ml CATCH pufrom + HEPES. Bunky boli odcentrifugované pri 208 x g 7 minút a resuspendované v 50 ml megakaryocytového rastového média (alfa modifikácia minimálneho esenciálneho média bez ribonukleozidov a dezoxýribonukleozidov), s 15 % tepelne inaktivovaného fetálneho bovinného séra, 2 mM L-glutamátom (zložky médií získané od JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), 1 mM pyruvátom sodným /Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 1 x PSN zmesou antibiotík (GIBCO BRL) a pridanými 1 000 aktivačnými jednotkami rekombinantného myšieho trombopoietínu/ml (koncentrovaného bezsérového kondicionovaného média z buniek BHK 570 stabilne transfekovaných myšou trombopoietínovou cDNA). Bunky boli potom nanesené na 150 mm misky pre tkanivové kultúry pri 10⁶ monojadrových bunkách/ml a nechané rásť v úplne zvlhčovanom inkubátore s 6,0 % CO₂ vo vzduch pri teplote 37 °C. Po troch dňoch rastu boli neadherované bunky odobraté do 50 ml centrifugačných kyviet a ochladené ľadom. Veľké bunky boli peletované centrifugáciou pri 33 x g 15 minút pri teplote 4 °C. Bunečné pelety boli resuspendované v 50 ml CATCH pufru + HEPES

pri izbovej teplote a stočené pri 33 x g 10 minút. (Všetky ďalšie kroky sa uskutočňujú pri izbovej teplote). Toto premytie sa zopakovalo s cieľom získať vyššiu čistotu zreých megakaryocytov. Zvyšné bunky sa resuspendovali v 15 ml CATCH pufri + HEPES (spojený objemom) a boli navrstvené na tri stupňové gradienty fetálneho bovinného séra (65 a 40 % v CATCH pufri + HEPES) na sedimentáciu pri 1 x g 30 minút. Spodných 5 ml z 65 %-ných frakcií sa spojilo, zriedilo na 50 ml CATCH pufrom + HEPES a stočilo pri 33 x g v čase 10 minút. Pelety obsahovali viac ako 10^7 buniek, ktoré boli testované na acetylcholinesterázu metódou Bursteina et al., (*J. Cell. Physiol.* 122, 159-165, 1985) a boli stanovené ako zrele megakaryocyty s čistotou vyššou ako 99 %. Peletované bunky boli potom lyzované v roztoku guanidín tiokyanátu/2-merkaptoetanolu na izoláciu RNA centrifugáciou v hustotnom gradiente chloridu cézneho.

Z megakaryocytovej RNA sa cDNA pripraví tak, ako je to uvedené vo vyššie uvedenom príklade 6.

Príklad 12

Mapovanie ľudského trombopoietínového génu fluorescenčnou in situ hybridizáciou

Do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky na ľade boli pridané nasledujúce zložky : 1 μ g λ ZGmp1-H8, λ ZGmp1-H10 alebo λ ZGmp1-H29 obsahujúceho ľudský trombopoietínový gén, 5 μ l 10 x "nick-translačného" pufri (0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP a 2,5 mM dCTP, 5 μ l 5 mM Bio-11-dUTP (5-(N-[N-biotinyl-E-aminokaproyl]-3-aminoallyl)-2'-deoxyuridín 5'-trifosfát, Sigma Chemical Co.), 5 μ l 100 mM DTT, 5 μ l DNázy (1000 x riedenie zo zásobného roztoku 10 U/ μ l, Boehringer Mannheim, bez RNázy), 2,5 μ l DNA polymerázy I (5 U/ μ l), voda do konečného objemu 50 μ l. Po zmiešaní boli reakcie inkubované pri 15 °C 2 hodiny v chladiacom mikrokúpeľi typu Boekel. Reakcie boli zastavené pridaním 5 μ l 0,5 M EDTA, pH 7,4. Sondy boli vyčistené použitím DNA-purifikačných centrifugačných koloniiek

Sephadex^R G-50 (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) podľa inštrukcií výrobcu. Na overenie veľkostí značených sond bolo 5 - 10 μ l každej vyčistenej sondy zmiešaných s 5 μ l nakladacieho gélového pufru (12,5 % ficoll a 0,2 % brómfenolová modrá, 0,2 M Tris-acetát, 0,1 mM octan sodný, 1 mM EDTA) a nechaných na mini-géli 0,7 % agarózy pri 80 V. Ako markery veľkosti v pároch báz (bp) sa použili λ -Hind III fragmenty (GIBCO BRL) a ϕ X-Hae III (fragmenty (GIBCO BRL). Digoxigenínom značená centromerická sonda špecifická pre chromozóm 3 (D3Z1) bola získaná od firmy Oncor (Gaithersburg, MD).

Metafázové chromozómy boli získané z kultúry buniek HEL. Do média v používanej 100 x 15 mm Petriho miske sa pridalo 100 μ l Colcemid^R (zásobný roztok 10 μ g/ml) a bunková kultúra sa inkubovala pri 37 °C. Po 2,5 - 3 hodinách sa z Petriho misky 10 ml sterilnou plastovou pipetou odobralo médium a prenieslo sa do 15 ml polypropylénovej kónickej skúmavky (Blue MaxTM, Becton Dickinson). Na Petriho misku 5 ml sterilnou plastovou pipetou sa pridalo 2 ml 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) na opláchnutie, a prenieslo sa kónickej skúmavky. Do Petriho misky sa sterilnou plastovou pipetou pridalo 2 ml trypsínu (GIBCO BRL, zásobný roztok), Petriho miskou sa jemne potrepalo a potom sa vložila na 3 - 5 minút do 37 °C inkubátora. Bunky sa potom plastovou pipetou zmyli z petriho misky a dali do skúmavky s médiom. Kultivačná skúmavka sa centrifugovala pri 250 x g 8 minút a celý supernatant až na 0,5 ml bol odstránený. Peleta sa resuspendovala poklepaním a potom sa pomaly a jemne pridalo 8 ml 0,075 M KCl (oredhriateho na 37 °C). Suspenzia sa opatrne premiešala a umiestnila do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C na 10 minút. Roztok sa centrifugoval pri 250 x g 5 minút a celý supernatant až na 0,5 ml nad peletou bol odstránený. Peleta sa resuspendovala poklepaním na skúmavku. Na fixovanie buniek sa po kvapkách pridali 2 ml studenej zmesi metanol/kyselina octová (3 : 1). Celkom sa takto pridalo 8 ml fixačnej zmesi. Skúmavka sa na 20 minút umiestnila do chladničky, následne sa potom centrifugovala 5 minút pri 250 x g. Supernatant bol znova odtiahnutý a fixačný proces opakovaný ešte dvakrát. Pri nanesení metafázových náterov

na 25 x 75 mm predčistené matné sklíčka (VWR Scientific, Media, PA) sa na každé sklíčko bodovo nanieslo pomocou 20 µl pipetoru Pipetman™ (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, WI) 5 µl 50 % kyseliny octovej a následne 5 µl suspenzie buniek. Sklíčka sa nechali vyschnúť na vzduchu a potom pred použitím sa nechali "dozrieť" cez noc v piecke (Boekel Industries, Inc., Philadelphia, PA) pri 42 °C. Na sklíčkach sa mikroskopom vybaveným kondenzorom pre fázový kontrast spočítali vhodné metafázové nátery. Niektoré preparácie metafázových chromozómov boli pred použitím na hybridizačné pokusy zafarbené na G-pruhy Gurrovým vylepšeným R66 Giems farbivom (BDH Ltd., Dorset, Anglicko), fotografované a odfarbené. Preparované sklíčka s nátermi ľudských metafázových chromozómov boli inkubované 2 hodiny v 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrát sodný, pH 7,0), krátko ponorené do vody a farbené v Gurrovom Giemsovom farbive, ktoré bolo pred použitím zriedené 1 : 4 Giemsovým pufrovacím roztokom, pH 6,5 (BDH Ltd.) a sfiltrované cez filter Whatman #1. Niektoré preparáty boli pred inkubáciou v SSC najprv 45 minút až hodinu inkubované v piecke pri 90 °C a potom sa nechali vychladnúť. Preparáty boli potom rolíšené v pufrovacom roztoku Giemsa, opláchnuté vodou a vysušené na vzduchu. Vhodné nátery metafázových chromozómov s G-pruhmi boli fotografované na mikroskope Olympus s použitím inverzného filmu Kodak Ektachrome™ 400, digitalizované a uložené použitím farebného video-kamerového systému Optronics ZVS-47E CCD RGB a software Optimus (od BioScan Inc., Edmonds, WA). Preparáty boli pred ďalším použitím odfarbované asi 20 min. v 100 % etanole a vysušené na vzduchu. Nepoužité preparáty sklíčok s metafázovými chromozómami boli skladované pri -70 °C.

Hybridizačné zmesi sa pripravovali v 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmavkách zmiešaním 2,5 µl kompetitorovej DNA (Cot-1 DNA, GIBCO BRL) 40-60 ng biotinylom značeného fága λZGmp1-H8, λZGmp1-H10 alebo λZGmp1-H29 (obsahujúceho ľudský trombopoietický gén), 7 µg nosičovej DNA (denaturovaná DNA lososích testes, Sigma Chemical Co.), 1 ml 3M NaOAc a 2 objemov etanolu; boli vákuovo odparené v koncentrácii typu Speedvac. Pelety boli rozpustené v 10 µl hybridizačného roztoku, pozostávajúceho z 10

% dextrán-sulfátu, 2 x SSC a 50 % formamidu (EM Science, Gibbstown, NJ). DNA sondy a kompetitorová DNA boli denaturované 5 minút pri 70 až 80 °C, ochladené na ľade a predhybridizované 1 až 2 hodiny pri 37 °C. Denaturácia chromozómov sa uskutočnila ponorením každej skličky do 70 % formamidu, 5 minút 2 x SSC pri 70 až 80 °C s nasledujúcim okamžitým ochladením v ľadovom 70 % etanole, potom v 100 % etanole, vždy 5 až 10 minút. Potom boli skličky tesne predtým, ako na ne boli pomocou 20 µl pipetora Gilson Pipetman™ pipetované hybridizačné zmesi, vysušené na vzduchu a zahriate na 42 °C. Hybridizačné zmesi a chromozómy boli potom pokryté 18 x 18 mm kryciami skličkami No. 1 (VWR Scientific). Hybridizácia prebiehala vo vlhkej komôrke cez noc pri 37 °C. V niektorých prípadoch sa po asi 6 hodinách hybridizačného času k preparátom pridalo 5 až 10 ng denaturovanej, digoxigenínom značenej centromerickej sondy D3Z1 (v hybridizačnom roztoku 10 % dextrán-sulfátu, 2 x SSC a 50 % formamidu).

Po odstránení krycích skličiek sa sklička s preparátmi premývali 3 x 5 minút v 50 % formamide, 2 x SSC pri 42 °C, 3 x 5 minút v 2 x SSC pri 42 °C, 1 x 3 minúty v 4 x SSC, 0,05 % monolauráte polyoxyetylénorbitanu (Tween-20, Sigma Chemical Co.). Nasledovala 20-minútová inkubácia s 4 x SSC, 5 % beztukového sušeného mlieka vo vlhkej komôrke (100 µl pod krycím skličkom 24 x 50 mm). Preparácie, ktoré zahrňovali centromerickú sondu D3Z1 pre chromozóm 3, sa 45 minút inkubovali s 1 : 100 riedeným biotínom značenej myšej antidigoxínovej protilátky v 4 x SSC/5 % BSA, nasledovalo trikrát 3-minútové premývanie v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20. Potom pre všetky preparácie nasledovali post-hybridizačné kroky s 20-minútovými inkubáciami s fluoresceín-značeným avidínom (Fluorescein vidin, DCS, Vector Laboratories, Burlingame, CA) (100 µl, 5 µg/ml, v 4 x SSC, 5 % beztukového sušeného mlieka) pod krycím skličkom 24 x 50 mm. Sklička boli potom premývané 3 x 3 minúty v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 s nasledujúcou 20 minútovou inkubáciou s biotinylovanou ovčou protilátkou proti avidínu D (afinitne čistenou) (5 µg/ml v 4 x SSC, 5 % beztukového sušeného mlieka) pod krycím skličkom 24 x 50 mm. Sklička boli znovu premývané 3 x 3 minúty v 4 x SSC,

0,05 % Tween-20 s nasledujúcou ďalšou inkubáciou s fluoresceín-značeným avidínom (100 μ l, 5 μ g/ml, v 4 x SSC, 5 % beztukového sušeného mlieka) pod krycím sklíčkom 24 x 50 mm. V niektorých prípadoch bol tento postup amplifikácie signálu zopakovaný ešte raz. Finálne premytie bolo 2 x 3 minúty v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 a 1 x 3 minúty v PBS. Sklíčka boli pripevnené na protitieniace médium pozostávajúce z 9 dielov glycerolu obsahujúceho 2 % 1,4-diazobicyklo-(2,2,2)-oktánu (DABCO, rozpustný pri 70 °C) a 1 diel 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 a 0,25 až 0,5 μ g/ml propídium jodidu. Sklíčka boli prezerané mikroskopom Olympus BH2 vybavenom BH2-RFC prídavným zariadením na fluorescenciu v odrazenom svetle, PM-10 ADS automatickým fotomikrografickým systémom, ZVS-47E, CCD RGB farebným video-kamerovým systémom Optronics a sadou filtrov FITC/Texas red, Chroma Technology Corp. (Brattlebow, VT) na vizualizáciu FITC. Obrazy náterov metafázových chromozómov boli digitalizované a uložené farebným video-kamerovým systémom Optronics a software Optimus.

Predbežné výsledky z postupu fyzikálneho mapovania ukázali, že miesto ľudského trombopoietínového génu je distálne k oblasti 3q26 ramena q chromozómu 3.

Príklad 13

Expresia myšej TPO cytokinínovej domény v *Saccharomyces cerevisiae*

Plazmid pABJ3-5 obsahuje promótor *S. cerevisiae* *TPI1*, sekrečnú zavádzaciu sekvenciu α -faktora, myšiu TPO kódujúcu sekvenciu (vzorec III) od bp 237 po 692, translačný terminátor *TPI1*, 2 μ sekvenciu pre replikáciu v kvasinkách a triocefosfát izomerázový gén *Schizosaccharomyces pombe* (*POT1* gén) na selekciu v kvasinkách. Tento plazmid bol určený na riadenie sekrécie myšej TPO bielkoviny obsahujúcej aminokyseliny 45 až 196 zo vzorca I.

Na konštrukciu pBJ3-5 bol pMVR1 (obr. 2) digero vaný SphI

a XbaI a bol získaný základ vektora, obsahujúceho 5' časť promótoru *TPII* a terminátor *TPI*. Do základu vektora boli vložené nasledujúce fragmenty:

- 1) SphI/HindIII fragment odvodený z pBS114, ktorý obsahuje 3' časť *TPII* promótoru a zavádzaciu sekvenciu α -faktora. Plazmid pBS114 je kvasinkový prehadzovací vektor, ktorý obsahuje promótor *TPII* a zavádzaciu sekvenciu α -faktoru nasledovanú sekvenciou poly-spojky, ktorá zahŕňa HindIII miesto.
- 2) PCR-generovaný HindII/SalI fragment obsahujúci HindII miesto určené na to, aby bolo v rovnakom čítacom rámci s HindIII miestom v zavádzacej sekvencii α -faktora, Kex2 miesto proteolytického štiepenia a myšiu TPO sekvenciu od bp 237 po 335 zo vzorca III.
- 3) SalI/EcoRI fragment obsahujúci myšie TPO páry báz od 336 po 692 zo vzorca III, ktorý bol odvodený z plazmidu pSL-MPL-100 (skonštruovaného amplifikáciou pZGmp1-1081 s použitím primerov ZC7319 (ACACTGAATTCTTCTCCACC CGGACAGAGT) a ZC7318 (TACCGAATTC TAGACACAGA GGGTGGGACC TTC), digesciou EcoRI a zaklonovaním fragmentu obsahujúceho cytokinínovú doménu a 5' nekódujúcu sekvenciu do EcoRI miesta Zem229R [69447]). Tento fragment bol zamenený na SalI/XbaI fragment jeho klonovaním do pIC19H, ktorý bol predtým digerovaný SalI a EcoRI.

Výsledný plazmid, označený pBJ3 (obr. 2) bol potom digerovaný BglII a XhoI na uvoľnenie celej kazety exprese obsahujúcej promótor, zavádzaciu sekvenciu, TPO kódujúcu sekvenciu a terminátor. Tento BglII/XhoI fragment bol vložený do pRPOT (zverejneného v US patente č. 5 128 321, ktorý je tu

zahrnutý ako odkaz) digerovaného BamHI a XhoI. Výsledný plazmid bol označený pBJ3-5.

S. cerevisiae kmeňa JG134 (*MAT α ura3-52 leu2- Δ 2 pep4- Δ 1 Δ tpil::URA3 [cir^o]*) boli transformované pBJ3-5 a pRPOT lítium acetátovým postupom (ako je všeobecne zverejnené Itoom et al., *J. Bacteriol.* 153, 163-168, 1983). Transformanty sa selektovali pomocou rastu na médiách obsahujúcich glukózu. JG134/pBJ3-5 a JG134/pRPOT rástli na tekutom médiu YEPD tri dni. Kultivačné médiá boli separované od buniek centrifugáciou a analyzované testom bunečnej proliferácie s BaF3 bunkami obsahujúcimi MPL receptor. Médiá z kmeňa JG134/pBJ3-5 obsahovali 5000 - 7000 jednotiek/ml TPO aktivity, zatiaľ čo negatívna kontrola JG134/pRPOT nemala žiadnu aktivitu. Tento výsledok ukazuje, že kvasinky môžu secerňovať biologicky aktívnu formu TPO.

Príklad 14

Aktivita rekombinantného ľudského TPO

Plazmidová DNA z dvoch bakteriálnych kultúr s pZGmp1-124 kultivovaných cez noc bola pripravená alkalickou lýziou buniek, nasledovanou naviazaním DNA k náplni pri vysokom obsahu soli (s použitím súpravy Magic Minipreps™ Sampler od Promega Corp.). DNA bola eluovaná 75 μ l 10 mM Tris, 1 mM EDT, pH 8,0.

Kultúry buniek BHK 570 boli pri 50 000 bunkách/ml transfekované pZGmp1-124 DNA. 20 μ l zriedenia 1 : 10 LIPOFECTAMINETM (GIBCO BRL) sa pridalo k 20 μ l plazmidovej DNA a 160 μ l bezsérového média (F/DV médium [zmes 1 : 1 DMEM a Ham F12] doplnené o 10 μ g/ml fetuínu, 2 ng/ml selénu, 5 μ g/ml inzulínu, 10 μ g/ml transferínu, 2 mM L-glutamínu, 110 μ g/ml pyruvátu sodného, 25 mM HEPES a 0,1 mM roztoku neesenciálnych aminokyselín (GIBCO BRL) pri izbovej teplote na 30 minút pred pridaním buniek BHK 570 a inkubácia prebiehala 4 hodiny pri teplote 37 °C. Potom sa pridalo 200 μ g rastového média (DMEM) doplneného o 110 μ g/ml pyruvátu sodného, 0,05 mg/ml penicilínu,

0,05 mg/ml streptomycínu, 0,01 mg/ml neomycínu, 25 mM HEPES, 10 % fetálneho telacieho séra a bunky sa inkubovali cez noc pri teplote 37 °C. Kultivačné médium sa nahradilo rastovým médiom obsahujúcim 5 % fetálneho telacieho séra a bunky sa inkubovali 4 hodiny pri teplote 37 °C.

Kondicionované médiá z transfektantov buniek BHK 570 sa testovali na schopnosť spôsobiť proliferáciu buniek exprimujúcich myšiu MPL receptor. Bunky rástli v BaF3 médiu (RPMI 1640 médium) doplnenom o 10 % fetálneho telacieho séra, 2 mM l-glutamínu, 1 mM pyruvátu sodného, 10 mM HEPES, 57 µM β-merkaptoetanolu, 0,05 mg/ml penicilínu, 0,05 mg/ml streptomycínu, 0,01 mg/ml neomycínu, 4 % (obj./obj.) kondicionovaného média z WEHI-3 buniek (kultivačný prídavok myšieho interleukínu-3). Pred testom sa BaF3 bunky zriedili a susupendovali v BaF3 médiu bez IL-3 na 10 000 buniek/100 µl. Pridalo sa 100 µl kondicionovaného média z buniek BHK 570 transfekovaných pZGmp1-124 a kultúry sa inkubovali pri 37 °C. Po 30 minútach a po 24 hodinách boli bunky vizuálne prezerané, či sa predlžujú. Testovala sa tiež negatívna kontrola, pozostávajúca z BaF3 média bez IL-3, a pozitívna kontrola kondicionovaného média z BHK 570 buniek transfekovaných myšou TPO DNA. Výsledky ukázali chýbajúce predlžovanie buniek BaF3 v negatívnej kontrole, určité predlžovanie buniek v pozitívnej kontrole a významné predlžovanie buniek v pZGmp1-124 transfekovaných bunkách.

Príklad 15

Afinitná precipitácia receptora

150 mm misky pre tkanivové kultúry, obsahujúce bunky, ktoré produkujú TPO alebo normálne bunky BHK, sa označovali 18 hodín s 10 ml Dulbeccovho MEM bez metionínu, obsahujúceho 2 mM L-glutamín, antibiotiká a 200 µCi preparátu ³⁵S-Express (Amersham, Arlington Heights, IL).

Po inkubácii cez noc boli použité médiá odobraté a skoncentrované 15-krát použitím koncentrátora Centriprep-10™.

Výsledných 0,7 ml koncentrovaného supernatantu sa zmiešalo s 40 µl rozpustného MPL receptora, ktorý mal pripojený poly-histidín a ktorý bol naviazaný podľa návodu dodávateľa na CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia). Zmes bola za trepania inkubovaná 2 hodiny na ľade.

Bunky boli premyté jedenkrát s PBS, potom lyzované 1 ml RIP A pufrom (10 mM Tris, pH 7,4, 1 % dezoxycholát, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl). Lyzát sa sцентриfugoval na odstránenie nerozpustného materiálu a pridalo sa 40 µl MPL-Sepharose ako je uvedené vyššie.

MPL-Sepharose potom bola usadená centrifugáciou pri malých otáčkach a použité médiá alebo bunkové lyzáty sa odstránili. Peleta bola premývaná štyrikrát s PBS obsahujúcim 0,5 M NaCl. Po poslednom premývaní sa PBS odstránil a pridalo sa 40 µl 2 x vzorkového pufru (10 % glycerol, 4 % SDS, 50 mM Tris, pH 7,0, 1 mM EDTA a 0,05 % brómfenolovej modrej) obsahujúceho 4 % β-merkaptoetanolu.

Vzorky sa 5 minút varili a po 18 µl z každej vzorky sa nanieslo na 10 až 20 % gradientový mini-gél (Integrated Separation Systems), a potom podrobili elektroforéze pri 100 V v čase 2 hodín. Gél bol 30 minút fixovaný (v 40 % metanole, 16 % ľadovej kyseliny octovej v destilovanej vode), potom namočený do roztoku Amplify™ (Amersham) na 20 minút.

Po vysušení bol gél cez noc exponovaný na film. -70 kDa pruh bol silne viditeľný v dráhe odpovedajúcej v použitých médiách z buniek transfekovaných TPO cDNA. Tento pruh nebol prítomný v použitých médiách z BHK buniek alebo v bunkových lyzátoch žiadnej bunečnej línie.

Z predchádzajúceho je zrejmé, že aj keď tu na účely vysvetľovania bolo popísané konkrétne uskutočnenie vynálezu, môžu sa bez odklonu ducha a rozsahu vynálezu uskutočňovať rôzne modifikácie vynálezu. V súlade s tým nie je tento vynález obmedzený inak než pripojenými nárokmi.

Zoznam sekvencií

Vzorec I

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

(pokr. Vzorca I)

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu
130 135 140

Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly
145 150 155 160

Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln
165 170 175

Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro
180 185 190

Thr Leu Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser
195 200 205

Thr Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly
210 215 220

Leu Leu Glu Thr Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala Gly Pro Gly
225 230 235 240

Leu Leu Ser Arg Leu Gln Gly Phe Arg Val Lys Ile Thr Pro Gly Gln
245 250 255

Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn
260 265 270

Arg Thr His Gly Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr
275 280 285

Ser Leu Gln Thr Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn
290 295 300

Lys Gly Ser Leu Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro
305 310 315 320

Ser Leu Ala Pro Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu
325 330 335

Pro Thr Thr His Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp
340 345 350

Pro Ser Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met
355 360 365

Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr
370 375

Vzorec II

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
20 25 30

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
35 40 45

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
50 55 60

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
65 70 75 80

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
85 90 95

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

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
115 120 125

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
130 135 140

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
145 150 155 160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
165 170 175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
180 185 190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
195 200 205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
210 215 220

(pokr. Vzorca II)

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
225 230 235 240

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
305 310 315 320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
340 345 350

Gly

Vzorec III

CCTCGTGCCG GTCCTGAGGC CTTCTCCAC CCGGACAGAG TCCTTGGCCC ACCTCTCTCC 60

CACCCGACTC TGCCGAAAGA AGCACAGAAG CTCAAGCCGC CTCC ATG GCC CCA GGA 116
Met Ala Pro Gly
1

AAG ATT CAG GGG AGA GGC CCC ATA CAG GGA GCC ACT TCA GTT AGA CAC 164
Lys Ile Gln Gly Arg Gly Pro Ile Gln Gly Ala Thr Ser Val Arg His
5 10 15 20

CTG GCC AGA ATG GAG CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT 212
Leu Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu
25 30 35

GCA GTG GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT GAC Ala Val Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp 40 45 50	260
CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC CTC CTT CAC AGC Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser 55 60 65	308
CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu 70 75 80	356
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu 85 90 95 100	404
CAG AGC AAG GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu 105 110 115	452
GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC CTC TCA TCC Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys Leu Ser Ser 120 125 130	500
CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC CTC CTC TTG GGG GCC CTG Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu 135 140 145	548
CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG CTT CCT CTA CAG GGC AGG ACC ACA GCT Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala 150 155 160	596
CAC AAG GAC CCC AAT GCC CTC TTC TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg 165 170 175 180	644
GGA AAG GTG CGC TTC CTG CTT CTG GTA GAA GGT CCC ACC CTC TGT GTC Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu Cys Val 185 190 195	692
AGA CGG ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC AGT ACT TCT CAA CTC Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Gln Leu 200 205 210	740

CTC ACA CTA AAC AAG TTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACG Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr 215 220 225	788
AAC TTC AGT GTC ACA GCC AGA ACT GCT GGC CCT GGA CTT CTG AGC AGG Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala Gly Pro Gly Leu Leu Ser Arg 230 235 240	836
CTT CAG GGA TTC AGA GTC AAG ATT ACT CCT GGT CAG CTA AAT CAA ACC Leu Gln Gly Phe Arg Val Lys Ile Thr Pro Gly Gln Leu Asn Gln Thr 245 250 255 260	884
TCC AGG TCC CCA GTC CAA ATC TCT GGA TAC CTG AAC AGG ACA CAC GGA Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn Arg Thr His Gly 265 270 275	932
CCT GTG AAT GGA ACT CAT GGG CTC TTT GCT GGA ACC TCA CTT CAG ACC Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr Ser Leu Gln Thr 280 285 290	980
CTG GAA GCC TCA GAC ATC TCG CCC GGA GCT TTC AAC AAA GGC TCC CTG Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn Lys Gly Ser Leu 295 300 305	1028
GCA TTC AAC CTC CAG GGT GGA CTT CCT CCT TCT CCA AGC CTT GCT CCT Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ala Pro 310 315 320	1076
GAT GGA CAC ACA CCC TTC CCT CCT TCA CCT GCC TTG CCC ACC ACC CAT Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr Thr His 325 330 335 340	1124
GGA TCT CCA CCC CAG CTC CAC CCC CTG TTT CCT GAC CCT TCC ACC ACC Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro Ser Thr Thr 345 350 355	1172
ATG CCT AAC TCT ACC GCC CCT CAT CCA GTC ACA ATG TAC CCT CAT CCC Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met Tyr Pro His Pro 360 365 370	1220
AGG AAT TTG TCT CAG GAA ACA TAGCGCGGGC ACTGGCCCAG TGAGCGTCTG Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr 375	1271

(pokr. Vzorca III)

CAGCTTCTCT CGGGGACAAG CTTCCCCAGG AAGGCTGAGA GGCAGCTGCA TCTGCTCCAG	1331
ATGTTCTGCT TTCACCTAAA AGGCCCTGGG GAAGGGATAC ACAGCACTGG AGATTGTAAA	1391
ATTTTAGGAG CTATTTTTTT TTAACCTATC AGCAATATTC ATCAGAGCAG CTAGCGATCT	1451
TTGGTCTATT TTCGGTATAA ATTTGAAAAT CACTA	1486

Vzorec IV

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
1 5 10 15	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
20 25 30	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
35 40 45	

(pokr. Vzorca IV)

CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala 50 55 60	192
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys 65 70 75 80	240
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met 85 90 95	288
GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly 100 105 110	336
CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu 115 120 125	384
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp 130 135 140	432
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val 145 150 155 160	480
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala 165 170 175	528
CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu 180 185 190	576
AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr 195 200 205	624
GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly 210 215 220	672

(pokr. Vzorca IV)

TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu 225 230 235 240	720
GAC CAA ATC CCC GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly 245 250 255	768
ACT CGT GGA CTC TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro 260 265 270	816
GAC ATT TCC TCA GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu 275 280 285	864
CAG CCT GGA TAT TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr 290 295 300	912
ACG CTC TTC CCT CTT CCA CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu 305 310 315 320	960
CAC CCC CTG CTT CCT GAC CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser 325 330 335	1008
CCT CTT CTA AAC ACA TCC TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu 340 345 350	1056
GGG TAA Gly	1062

CTTTCTTGCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTCT TTCTTTTTTT TTTTGAGAC GGAGTTTCAC	60
TCTTATTGCC CAGGCTGGAG TGCAATGGTG CGATCTCGGC TCACCACAAC CTCCGCCTCC	120
CAGGTACAAG CGATTCTCCT GTCTCAGCCT CCCAAGTAGC TTGGATTACA GGCATGAACC	180
ACCACACCTT GCTAGTTTTT TTGTATTTTCG TAGAGCCGGG GTTTCACCAT GTTAGTGAGG	240
CTGGTGGCGA ACTCCTGACC TCAGGTGATC CACCCGCCTT GGA CTCCAA AGTGCTGGGA	300
TTACAGGCAT GAGCCACTGC ACCCGGCACA CCATATGCTT TCATCACAAG AAAATGTGAG	360
AGAATTCAGG GCTTTGGCAG TTCCAGGCTG GTCAGCATCT CAAGCCCTCC CCAGCATCTG	420
TTCACCCTGC CAGGCAGTCT CTTCTAGAA ACTTGGTTAA ATGTTCACTC TTCTTGCTAC	480
TTTCAGGATA GATTCTTCAC CCTTGGTCCG CCTTTGCCCC ACCCTACTCT GCCCAGAAGT	540
GCAAGAGCCT AAGCCGCCTC CATGGCCCCA GGAAGGATTC AGGGGAGAGG CCCCAAACAG	600
GGAGCCACGC CAGCCAGACA CCCCAGCCAG A ATG GAG CTG ACT G GTGAGAACAC	654
Met Glu Leu Thr	
1	
ACCTGAGGGG CTAGGGCCAT ATGGAAACAT GACAGAAGGG GAGAGAGAAA GGAGACACGC	714
TGCAGGGGGC AGGAAGCTGG GGGAAACCAT TCTCCCAAAA ATAAGGGGTC TGAGGGGTGG	774
ATTCCCTGGG TTTCAGGTCT GGGTCCTGAA TGGGAATTCC TGGAATACCA GCTGACAATG	834
ATTCCTCCT CATCTTTCAA CCTCACCTCT CCTCATCTAA G AA TTG CTC CTC	886
Glu Leu Leu Leu	
5	
GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT	934
Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala	
10 15 20	
CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC	982
Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser	
25 30 35 40	

CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG GTGAGAACTC CCAACATTAT CCCCTTTATC	1033
His Val Leu His Ser Arg Leu	
45	
CGCGTAACTG GTAAGACACC CATACTCCCA GGAAGACACC ATCACTTCCT CTAACCTCCT	1093
GACCCAATGA CTATTCTTCC CATATTGTCC CCACCTACTG ATCACACTCT CTGACAAGGA	1153
TTATTCTTCA CAATACAGCC CGCATTAAAA AGCTCTCGTC TAGAGATAGT ACTCATGGAG	1213
GACTAGCCTG CTTATTAGGC TACCATAGCT CTCTCTATTT CAGCTCCCTT CTCCCCCCAC	1273
CAATCTTTTT CAACAG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA	1322
Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr	
50 55	
CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC	1370
Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr	
60 65 70	
CAG ATG GTAAGAAAGC CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT	1426
Gln Met	
75	
CCCCTGCTT CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAATAT CTCACCTTCA	1486
GCTTGGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG ATAAGATGAT	1546
GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTT GAAGCTGAAC ACCATGAAAA GCTGGAGAGA	1606
AATCGCTCAT GGCCATGCCT TTGACCTATT CCCGTTCACT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG	1666
AAGCAAGACT CATATGTCAT CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC	1726
AAAAGACTGA ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC	1786
AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAATCCCA GCACTTTGGG	1846
AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG AGCAGCCTGG CCAACATGGC	1906
GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAGAAT TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT	1966
CCCAGCTACT TGGAAGGCTG AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA	2026
GTGAGCTGAG ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA	2086

AAAAGAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC CAGCTTTCAG	2146
GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT AGCACTTCCT ACGAAAAGGA	2206
TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA CCATGTAACA TTAAGAAGC TGCTATTCTT	2266
AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA	2326
GAAGCTCTATT CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT	2386
GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAAC TAACATGTGT CTAGAAAGCA	2446
GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG CAATAGTTTA AAAAATAAAA	2506
ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTTC TTCCTTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG	2566
CAGTTCCTAT GGGTCCCTTC TAGTCCTTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT	2626
CTCATACCTA CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC	2686
CCAGGCTGGA GTGCAGTGGG ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC CCGGATTCAA	2746
GCGATTCTCC TGTCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC AGGTGCCCAC CACCATGCCC	2806
AGCTAATTTG TGTATTTGTG GTAGAGATGG GGTTTCACCA TGTGGGCAG GCTGATCTTG	2866
AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG	2926
TGAGCCACTG CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG	2986
CAGAAAGAGT AAATTTGCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA GGGCAGATTT	3046
CAGCAACGTA AGAAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA AGTGTAAGAC CAGGCTGGAC	3106
TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG CTGATGACCA GCTGTCGGGA GACTGTGAAG	3166
GAATTCCTGC CCTGGGTGGG ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCATC	3226
TGCTGGCTAC TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTGAGG CAGTGCGCTT	3286
CTCTCTTCCA TCTCTTCTC AG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA	3338
Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly	

80

85

GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu 90 95 100	3386
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val 105 110 115	3434
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln 120 125 130	3476
GTAAGTCCCC AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCCCTAGAA	3536
GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG ATCTACTAAG	3596
AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC TGTCTTTCCT ACTTAGACAA	3656
GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAG	3712
CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile 135 140 145	3760
TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met 150 155 160	3808
CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr 165 170 175 180	3856
GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro 185 190 195	3904
AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg 200 205 210	3952
ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys 215 220 225	4000

(pokr. Vzorca V)

ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro 230 235 240	4048
GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu 245 250 255 260	4096
TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser 265 270 275	4144
GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr 280 285 290	4192
TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro 295 300 305	4240
CTT CCA CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu 310 315 320	4288
CCT GAC CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn 325 330 335 340	4336
ACA TCC TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 345 350	4385
AGACACTGCC GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCCTG	4445
GGAGACAACT GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA	4505
TACACAGGAC TGAAAAGGGA ATCATTTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT	4565
TTTTTAAGCT ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCAGA	4625
AATTTGCAAC TCACTGATTC TCAACATGCT CTTTTTCTGT GATAACTCTG CAAAGACCTG	4685

(pokr. Vzorca V)

GGCTGGCCTG GCAGTTGAAC AGAGGGAGAG ACTAACCTTG AGTCAGAAAA CAGAGGAAGG 4745
GTAATTTCTT TTGCTTCAAA TTCAAGGCCT TCCAACGCCC CCATCCCCTT TACTATCATT 4805
CTCAGTGGGA CTCTGATC 4823

Vzorec VI

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

(pokr. Vzorcu VI)

Ser	Gln	Ser	Val	Pro	Thr	Phe	Gly	Thr	Arg	Tyr	Val	Cys	Gln	Phe	Pro	85	90	95	
Ala	Gln	Asp	Glu	Val	Arg	Leu	Phe	Phe	Pro	Leu	His	Leu	Trp	Val	Lys	100	105	110	
Asn	Val	Ser	Leu	Asn	Gln	Thr	Leu	Ile	Gln	Arg	Val	Leu	Phe	Val	Asp	115	120	125	
Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Gly	130	135	140	
Ser	Gln	Pro	Gly	Glu	Leu	Gln	Ile	His	Trp	Glu	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	145	150	155	160
Ile	Ser	Asp	Phe	Leu	Arg	His	Glu	Leu	Arg	Tyr	Gly	Pro	Thr	Asp	Ser	165	170	175	
Ser	Asn	Ala	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Glu	Thr	180	185	190	
Cys	Cys	Pro	Thr	Leu	Trp	Met	Pro	Asn	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Asp	Gln	195	200	205	
Pro	Pro	Cys	Val	His	Pro	Thr	Ala	Ser	Gln	Pro	His	Gly	Pro	Val	Arg	210	215	220	
Thr	Ser	Pro	Ala	Gly	Glu	Ala	Pro	Phe	Leu	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Ser	225	230	235	240
Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Gly	Lys	Ser	Tyr	Trp	Leu	Gln	Leu	245	250	255	
Arg	Ser	Gln	Pro	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Gly	Ser	Trp	Gly	Pro	Trp	260	265	270	
Ser	Phe	Pro	Val	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Thr	Ile	Gly	275	280	285	
Leu	Gln	Cys	Phe	Thr	Leu	Asp	Leu	Lys	Met	Val	Thr	Cys	Gln	Trp	Gln	290	295	300	
Gln	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Phe	Phe	Arg	His	Ser	Arg	Thr	305	310	315	320

(pokr. Vzorca VI)

Arg Cys Cys Pro Thr Asp Arg Asp Pro Thr Trp Glu Lys Cys Glu Glu
325 330 335

Glu Glu Pro Arg Pro Gly Ser Gln Pro Ala Leu Val Ser Arg Cys His
340 345 350

Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu Val Glu Val Thr
355 360 365

Thr Ala Gln Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp Ile
370 375 380

His Gln Ala Val Leu Leu Pro Thr Pro Ser Leu His Trp Arg Glu Val
385 390 395 400

Ser Ser Gly Arg Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Gln Ser Ser Trp Ala
405 410 415

Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly Arg Glu
420 425 430

Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Ser Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr Leu
435 440 445

Glu Leu Arg Pro Arg Ala Arg Tyr Ser Leu Gln Leu Arg Ala Arg Leu
450 455 460

Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ala Trp Ser Pro Pro Ala
465 470 475 480

Arg Val Ser Thr Gly Ser Glu Thr Ala Trp Ile Thr Leu Val Thr Ala
485 490 495

Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu Ser Ala Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
500 505 510

Lys Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp
515 520 525

Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp
530 535 540

Thr Ala Ala Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Val Thr Asp Ser Cys Glu
545 550 555 560

(pokr. Vzorca VI)

Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Ser
565 570 575

Thr Pro Leu Pro Leu Cys Pro Ser Gln Pro Gln Met Asp Tyr Arg Gly
580 585 590

Leu Gln Pro Cys Leu Arg Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro Met
595 600 605

Ala Glu Thr Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser Tyr
610 615 620

Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro
625 630

Vzorec VII

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

(pokr. Vzorca VII)

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
305 310 315 320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
340 345 350

Gly

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaná bielkovina, vybraná zo skupiny pozostávajúcej z
 - a) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196,
 - b) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 206,
 - c) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173,
 - d) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 175,
 - e) alelických variantov a), b), c) a d), a
 - f) druhových homológov a), b), c), d) a e), pričom bielkovina stimuluje proliferáciu a diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekursorov.
2. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovina obsahuje sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 379.
3. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovina obsahuje sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 353.
4. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovinou je myšia bielkovina.
5. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovinou je ľudská bielkovina.
6. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovina obsahuje

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 379,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 24 po aminokyselinový zvyšok 196,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 24 po aminokyselinový zvyšok 206,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 24 po aminokyselinový zvyšok 379,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 196,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 206,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 379.

7. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovina obsahuje

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 173,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 175,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 1 po aminokyselinový zvyšok 353,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 353.

8. Izolovaná bielkovina podľa nároku 1, pričom bielkovina obsahuje

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 206,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 379,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 175,

sekvenciu aminokyselín podľa vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 353.

9. Izolovaná bielkovina, ktorá stimuluje proliferáciu a diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekurzorov, pričom uvedená bielkovina obsahuje úsek, ktorý je na úrovni aminokyselín aspoň na 80 % identický s aminokyselinovou sekvenciou vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196, alebo so sekvenciou aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173.

10. Izolovaná polynukleotidová molekula kódujúca bielkovinu podľa nároku 1.

11. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 10, pričom molekulou je DNA molekula, obsahujúca kódujúce vlákno, ktoré obsahuje nukleotidovú sekvenciu vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692.

12. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 10, pričom molekulou je DNA molekula, obsahujúca kódujúce vlákno, ktoré obsahuje nukleotidovú sekvenciu vzorca IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519.

13. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 10, pričom uvedená molekula kóduje aminokyselinovú sekvenciu vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196.

14. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 10, pričom uvedená molekula kóduje aminokyselinovú sekvenciu vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173.

15. Izolovaná polynukleotidová molekula vybraná zo skupiny pozostávajúcej z

a) DNA molekúl kódujúcich hematopoetickú bielkovinu a obsahujúcich sekvenciu nukleotidov podľa vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692,

b) DNA molekúl kódujúcich hematopoetickú bielkovinu a obsahujúcich sekvenciu nukleotidov podľa vzorca IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519,

- c) alelických variantov a) alebo b),
- d) DNA molekúl kódujúcich hematopoetickú bielkovinu, ktorá je v aminokyselinovej sekvencii aspoň na 80 % identická s bielkovinami kódovanými v a), b) alebo c),
- e) molekúl komplementárnych k a), b), c) alebo d).

16. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 15, pričom uvedená molekula kóduje hematopoetickú bielkovinu, ktorá je v aminokyselinovej sekvencii aspoň na 90 % identická s bielkovinami kódovanými v a), b) alebo c).

17. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 15, pričom uvedená molekula zahŕňa nukleotid 237 až nukleotid 722 podľa vzorca III alebo nukleotid 64 až nukleotid 525 podľa vzorca IV.

18. Izolovaná DNA molekula vybraná zo skupiny obsahujúcej

- a) *EcoRI-XhoI* inzert plazmidu pZGmp1-1081 (ATCC 69566),
- b) alelické varianty a) a
- c) DNA molekuly kódujúce bielkovinu, ktorá je vo svojej aminokyselinovej sekvencii aspoň na 80 % identická s bielkovinou kódovanou a) alebo b), pričom uvedená izolovaná DNA molekula kóduje bielkovinu s hematopoetickou aktivitou.

19. Izolovaná polynukleotidová molekula podľa nároku 18, pričom uvedená molekula kóduje polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196.

20. Vektor expresie, ktorý obsahuje nasledujúce funkčne spojené prvky:

- promótor transkripcie,
- úsek DNA, vybraný zo skupiny zahŕňujúcej
 - a) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692,
 - b) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca IV od nukleotidu 64 po

nukleotid 519,

c) alelické varianty a) alebo b) a

d) DNA úseky kódujúce hematopoetickú bielkovinu, ktorá je vo svojej aminokyselinovej sekvencii aspoň na 80 % identická s bielkovinou kódovanou a), b) alebo c), a transkripčný terminátor.

21. Vektor expresie podľa nároku 20, pričom uvedený úsek DNA kóduje hematopoetickú bielkovinu, ktorá v aminokyselinovej sekvencii je aspoň na 90 % identická s bielkovinami kódovanými v a), b) alebo c).

22. Vektor expresie podľa nároku 20, pričom uvedený úsek DNA zahŕňa nukleotid 237 až nukleotid 722 podľa vzorca III alebo nukleotid 64 až nukleotid 525 podľa vzorca IV.

23. Vektor expresie podľa nároku 20, obsahujúci ďalej sekvenciu signálu sekrécie funkčne spojenú s uvedeným úsekom DNA.

24. Kultivované bunky, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že bol do nich zavedený vektor expresie podľa nároku 20, pričom uvedené bunky exprimujú hematopoetickú bielkovinu kódovanú uvedeným úsekom DNA.

25. Kultivované bunky podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že sú nimi bunky húb.

26. Kultivované bunky podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že sú nimi bunky kvasiniek.

27. Kultivované bunky podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že sú nimi bunky cicavcov.

28. Kultivované bunky podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že sú nimi bakteriálne bunky.

29. Cicavec, iný ako človek, v y z n a č u j ú c i s a

t ý m, že do jeho zárodočnej línie bol zavedený úsek heterológnej DNA, vybranej zo skupiny zahrňujúcej

a) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca III od nukleotidu 237 po nukleotid 692,

b) úsek DNA kódujúci hematopoetickú bielkovinu a obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vzorca IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519,

c) alelické varianty a) alebo b) a

d) DNA úseky kódujúce hematopoetickú bielkovinu, ktorá je vo svojej aminokyselinovej sekvencii aspoň na 80 % identická s bielkovinou kódovanou a), b) alebo c),

pričom uvedený cicavec produkuje hematopoetickú bielkovinu kódovanú uvedeným úsekom DNA.

30. Cicavec, iný ako človek, podľa nároku 29, v y z n a - č u j ú c i s a t ý m, že je vybraný zo skupiny zahrňujúcej ošípané, kozy, ovce, dobytok a myši.

31. Cicavec, iný ako človek, podľa nároku 29, v y z n a - č u j ú c i s a t ý m, že uvedený úsek DNA zahrňuje nukleotid 237 až nukleotid 722 podľa vzorca III alebo nukleotid 64 až nukleotid 525 podľa vzorca IV.

32. Spôsob prípravy hematopoetickej bielkoviny, v y z n a - č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje kultiváciu buniek, do ktorých bol zavedený vektor exprese podľa nároku 20, pričom uvedené bunky exprimujú hematopoetickú bielkovinu kódovanú uvedeným úsekom DNA a získanie hematopoetickej bielkoviny.

33. Spôsob prípravy hematopoetickej bielkoviny podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že hematopoetická bielkovina je uvedenými bunkami secernovaná a je získaná z média, ktorom sa uvedené bunky kultivujú.

34. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje bielkovinu podľa nároku 1 v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom.

35. Protilátka, ktorá sa viaže na epitop bielkoviny podľa nároku 1.

36. Spôsob stimulácie tvorby krvných doštičiek u cicavca, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že cicavcovi sa podáva terapeuticky účinné množstvo hematopoetickej bielkoviny vybranej zo skupiny pozostávajúcej z

a) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca I od aminokyselinového zvyšku 45 po aminokyselinový zvyšok 196,

b) bielkovín obsahujúcich sekvenciu aminokyselín vzorca II od aminokyselinového zvyšku 22 po aminokyselinový zvyšok 173,

c) alelických variantov a) alebo b) a

d) druhových homológov a, b) alebo c),

pričom bielkovina stimuluje proliferáciu a diferenciáciu myeloidných alebo lymfoidných prekursorov, v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom.

37. Sonda, ktorá obsahuje oligonukleotid s aspoň 14 nukleotidmi, pričom sekvencia tohto nukleotidu je aspoň na 80 % identická s časťou rovnakej dĺžky zo

a) vzorca III

b) vzorca IV

c) vzorca V

d) sekvencií komplementárnych k sekvenciám vzorca III, vzorca IV alebo vzorca V.

38. Spôsob na detekciu DNA molekuly kódujúcej trombopoietín v zmesi DNA molekúl, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje sondovanie zmesi DNA molekúl sondou, ktorá obahuje oligonukleotid s aspoň 14 nukleotidmi, pričom sekvencia tohto nukleotidu je aspoň na 80 % identická s časťou rovnakej dĺžky zo

a) vzorca III

b) vzorca IV

c) vzorca V

d) sekvencií komplementárnych k sekvenciám vzorca III, vzorca IV alebo vzorca V

a detekciu DNA molekúl, s ktorými sonda hybridizuje.

39. Spôsob stimulácie bunečnej proliferácie, v y z n a -
č u j ú c i s a t ý m, že sa ku kultivovaným bunkám kostnej
drene pridáva izolovaná bielkovina podľa nároku 1 v množstve
dostačujúcom na stimuláciu bunečnej proliferácie.

40. Spôsob podľa nároku 39, v y z n a č u j ú c i s a
t ý m, že uvedenými bunkami sú megakaryocyty alebo prekursor
megakaryocytov.

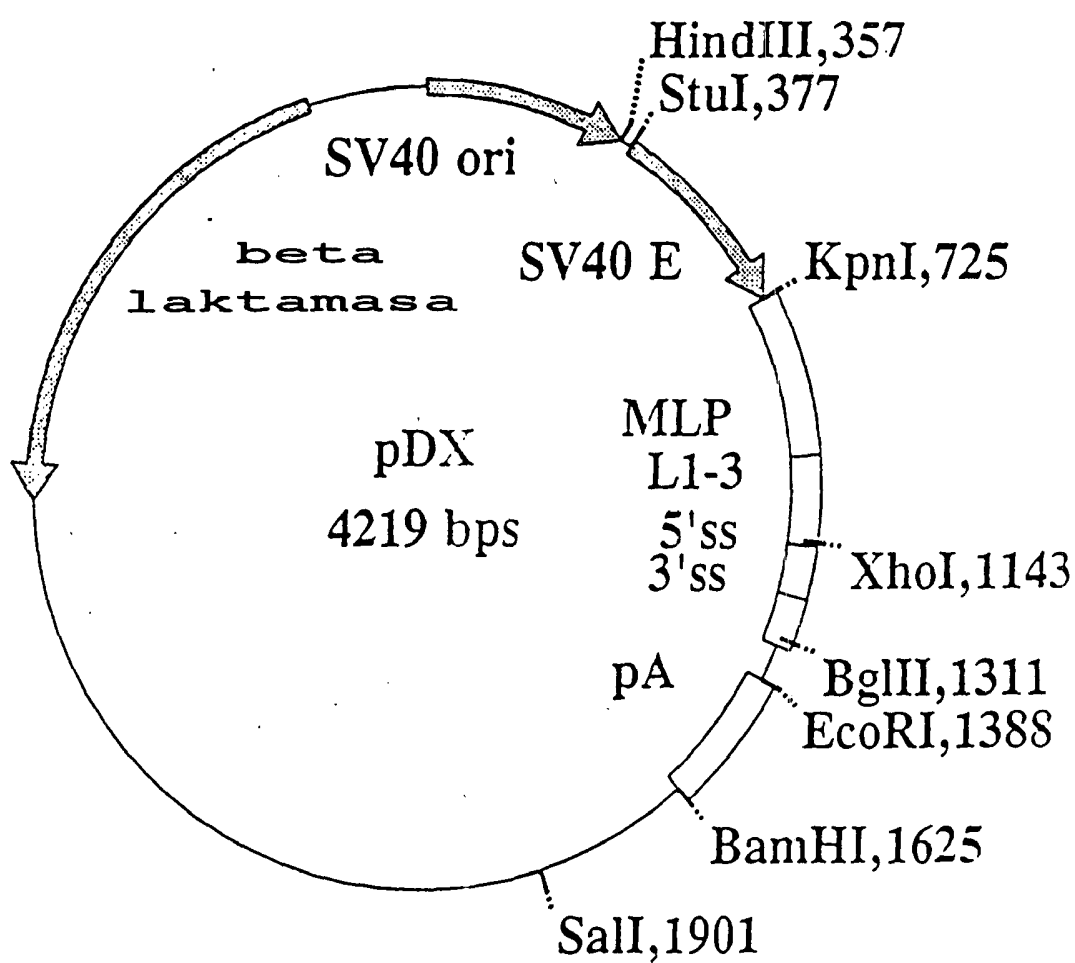
41. Spôsob čistenia trombopoietínu, v y z n a č u j ú c i
s a t ý m, že zahŕňa

vystavenie roztoku obsahujúceho trombopoietín protilátke
naviazanej na pevnú podložku, pričom táto protilátka sa viaže na
epitop bielkoviny podľa nároku 1,

premytie protilátky na odstránenie nenaviazaných
kontaminujúcich látok,

elúciu naviazaného trombopoietínu z protilátky a

získanie eluovaného trombopoietínu.



Obr. 1

Obr. 2

