

(19) C2 (11) 65519 (13) UA

(98) а/с 98, м. Київ, 02166

(85) null

(74) Федорова Ірина Олександрівна, (UA)

(45) [2004-04-15]

(43) null

(24) 2004-04-15

(22) 1995-03-30

(12) null

(21) 96010112

(46) 2004-04-15

(86) 1995-03-30 PCT/US95/03776

(30) 08/221768 1994-03-31 US 08/252628 1994-05-31 US 08/321488 1994-10-12 US 08/347780 1994-11-30
US

(54) КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ СТИМУЛЮВАННЯ РОСТУ І ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ МЕГАКАРІОЦИТІВ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ
СТИМУЛЯЦИИ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕГАКАРИОЦИТОВ COMPOSITIONS AND METHOD FOR STIMULATING GROWTH AND
DIFFERENTIATION OF MEGACARYOCYTES

(56) I.Vigon et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogen: Identification of a m
ember of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1992, V.89, P.5640-5644. 3 R.C.Skoda et al.

Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. The EMBO J
ournal, 1993, V.12, N7, P.2645-2653. 3 M.Souyri et al. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloprolifer
ative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. Cell, 1990, V.63, P.1137-1147. 3 US A 5087448 11.02.92 2 C.Delgado et
al. The uses and properties of PEG-linked proteins. Critical Reviews in Drug Carrier Systems, 1992, V.9, N3, P.249-304. 3

(71)

(72) US Бартли Тімоті Д. US Бартли Тімоті Д. US Бартли Тімоті Д. US Богенбергер Джекоб М. US Богенбергер Дже
коб М. US Богенбергер Джекоб М. US Босселман Роберт А. US Босселман Роберт А. US Босселман Роберт А. US Хант П
амела US Хант Памела US Хант Памела US Кінстлер Олаф Б. US Кінстлер Олаф Б. US Кінстлер Олаф Б. US Самал Бабру Б.
US Самал Бабру Б. US Самал Бабру Б.

(73) US АМГЕН ІНК. US АМГЕН ІНК US AMGEN INC.

Описаны факторы роста и дифференцировки мегакариоцитов (ФРДМ); их производные, содержащие молекулы ФРДМ, соединенные с водорастворимыми полимерами, такими как полиэтиленгликоль; способы получения таких производных; фармацевтические композиции.

Описано фактори росту та диференціювання мегакаріоцитів (ФРДМ); їхні похідні, що містять молекули ФРДМ, сполучені з водорозчинними полімерами, такими як поліетиленгліколь; способи отримання таких похідних; фармацевтичні композиції.

The factors of growth and differentiation of megacaryocytes and their derivatives combined with water-soluble polymers such as polyethylene glycol are disclosed as well as the methods for their synthesis and the pharmaceutical compositions.

1. Моноэгированный полипептид фактора роста и дифференцировки мегакариоцитов (ФРМД), включающий аминокислоты 22-184, фиг. 11, в котором полиэтиленгликолевая группа прикреплена к N-концу полипептида.
2. Моноэгированный полипептид ФРМД по п. 1, **отличающийся** тем, что полиэтиленгликолевая группа имеет среднюю молекулярную массу от 2 до 100 кД.
3. Моноэгированный полипептид ФРМД по п. 1 или 2, **отличающийся** тем, что полипептид ФРМД получают в клетке *E. Coli*.
4. Способ крепления водорастворимого полиэтиленгликоля к полипептиду ФРМД, включающему аминокислоты 22-184, фиг. 11, заключающийся в том, что контактируют полипептид ФРМД с полиэтиленгликолем в таких условиях, чтобы полипептид ФРМД соединился с полиэтиленгликолем для получения N-конца моноэгированного полипептида ФРМД.
5. Способ по п. 4, **отличающийся** тем, что полиэтиленгликоль прикрепляется к полипептиду ФРМД в условиях восстановительного алкилирования при достаточно кислом значении pH, чтобы альфа-аминогруппа на N-конце полипептида ФРМД была реакционноспособной.
6. Способ по п. 4 или 5, **отличающийся** тем, что полипептид ФРМД является моноэгированным с полиэтиленгликолем, имеющим среднюю молекулярную массу от 2 до 100 кД.
7. Способ по любому из пп. 4-6, **отличающийся** тем, что полипептид ФРМД получают отщеплением Met²Lys⁻¹ от полипептида, полученного путем экспрессии в клетке *E. Coli* последовательности ДНК, кодирующей полипептид, содержащий аминокислоты 22-184, фиг. 11, и последовательность Met-Lys на N-конце ее.
8. Способ по любому из пп. 4-6, **отличающийся** тем, что полипептид ФРМД получают:
 - а) путем экспрессии в клетке *E. Coli* последовательности ДНК, кодирующей полипептид, содержащий аминокислоты 22-184, фиг. 11 и последовательность Met-Lys на N-конце ее;
 - б) выделения экспрессированного полипептида, и
 - в) отщепления Met²Lys⁻¹ от выделенного полипептида.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая моноэгированный полипептид ФРМД по любому из пп. 1-3 и фармацевтически приемлемый разбавитель, адъювант или носитель.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитарных осложнений.
11. Фармацевтическая композиция по п. 9, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении.
12. Фармацевтическая композиция по п. 9, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении, вызванной химиотерапией, радиационной терапией или трансплантацией костного мозга.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая моноэгированный полипептид ФРМД, изготовленный по способу по любому из пп. 4-8, и фармацевтически приемлемый разбавитель, адъювант или носитель.
14. Фармацевтическая композиция по п. 13, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитарных осложнений.
15. Фармацевтическая композиция по п. 13, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении.
16. Фармацевтическая композиция по п. 13, **отличающаяся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении, вызванной химиотерапией, радиационной терапией или трансплантацией костного мозга.
17. Моноэгированный полипептид ФРМД по любому из пп. 1-3, **отличающийся** тем, что используется как медикамент.
18. Моноэгированный полипептид ФРМД, изготовленный по способу по любому из пп. 4-8, **отличающийся** тем, что используется как медикамент.
19. Моноэгированный полипептид ФРМД по любому из пп. 1-3, **отличающийся** тем, что используется в производстве медикаментов для лечения тромбоцитарных осложнений.
20. Моноэгированный полипептид ФРМД, изготовленный по способу по любому из пп. 4-8, **отличающийся** тем, что используется в производстве медикаментов для лечения тромбоцитарных осложнений.
21. Моноэгированный полипептид ФРМД по любому из пп. 1-3, **отличающийся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении.
22. Моноэгированный полипептид ФРМД, изготовленный по способу по любому из пп. 4-8, **отличающийся** тем, что используется для лечения тромбоцитопении.
23. Моноэгированный полипептид ФРМД по любому из пп. 1-3, **отличающийся** тем, что используется в производстве медикаментов для лечения тромбоцитопении, вызванной химиотерапией, радиационной терапией или трансплантацией костного мозга.
24. Моноэгированный полипептид ФРМД, изготовленный по способу по любому из пп. 4-8, **отличающийся** тем, что используется в производстве медикаментов для лечения тромбоцитопении, вызванной химиотерапией, радиационной терапией или трансплантацией костного мозга.

Настоящее изобретение относится к новым белкам, обозначенным как Mpl-лиганды или MGDF, которые стимулируют рост мегакариоцитов и усиливают дифференцировку или созревание мегакариоцитов, что неизбежно ведет к увеличению числа тромбоцитов. Кроме того, изобретение относится к способам получения данных белков в гомогенной форме из природных источников и методами генетической инженерии.

С другой стороны, настоящее изобретение тесно связано с новым классом MGDF-производных, в которых молекула MGDF соединена с водорастворимым полимером. Описаны также способы получения подобных производных. Кроме того, в настоящем изобретении описаны MGDF-производные, в которых молекула MGDF соединена с одной или более полиэтиленгликолевыми ("ПЭГ") группами, а также методы их получения.

Уровень техники

Настоящее изобретение затрагивает по меньшей мере две широкие области исследований. Первая из них - развитие мегакариоцитов с последующим образованием тромбоцитов, а вторая - свойства полипептида, входящего в семейство рецепторов факторов роста, обозначенного как Mpl-рецептор, и его лигандов. Каждая из указанных областей исследований будет более подробно рассмотрена ниже.

А. Образование тромбоцитов из мегакариоцитов

Тромбоциты крови - это циркулирующие клетки, которые играют важную роль в предотвращении кровопотери и свертывании крови. Мегакариоциты являются клеточным источником тромбоцитов и происходят из общей костномозговой клетки предшественника, которая дает начало всем росткам кроветворения. Эта общая клетка-предшественник известна как плюрипотентная стволовая клетка или PPSC.

Иерархия мегакариоцитарных клеток-предшественников была определена на основе времени появления и размера мегакариоцитарных(МК) колоний, образующихся в системах культивирования *in vitro* в ответ на воздействие соответствующих ростовых факторов. Бурст-образующая мегакариоцитарная клетка(BFU-MK) является наиболее примитивной мегакариоцитарной клеткой-предшественником. Считается, что BFU-MK дает начало многочисленным колониобразующим мегакариоцитам(CFU-MK), представляющим собой более дифференцированные МК клетки-предшественники.

По мере того, как МК клетки проходят последовательную дифференцировку, они утрачивают способность к митозу, но приобретают способность к эндоредупликации. Эндоредупликация(или эндомитоз) - это феномен ядерного деления в отсутствие деления клетки. Эндоредупликация неизбежно приводит к образованию полиплоидных МК клеток. Дальнейшее созревание МК приводит к приобретению цитоплазматических органелл и компонентов мембраны, характерных для тромбоцитов.

Тромбоциты образуются из зрелых МК посредством малоизученного процесса, который, как считают, является следствием физической фрагментации МК. Возможны и другие механизмы. Обнаружение в мегакариоцитах протяженных мембранных структур привело к формированию модели образования тромбоцитов, согласно которой разделяющая мембранная система отделяет образующиеся тромбоциты внутри клетки. Другая модель образования тромбоцитов основывается на том факте, что мегакариоциты образуют длинные цитоплазматические отростки, примерно соответствующие по диаметру размеру тромбоцита. Предположительно, от этих отростков и отрываются тромбоциты под действием тока крови в костном мозге и/или в легких. Эти цитоплазматические отростки были названы Бекером и ДеБрюном протромбоцитами, чтобы подчеркнуть их предполагаемую роль предшественников в процессе формирования тромбоцитов [см. Becker and DeBruyn, Amer. J. Anat. 145: 183(1976)].

На фиг.1 представлены различные клетки-предшественники, участвующие в развитии мегакариоцитов и тромбоцитов. Крайняя левая клетка на рисунке - PPSC, правее от нее - BFU-MK, за которой следует CFU-MK. Клетка, претерпевающая эндоредупликацию и расположенная сразу же справа от PPSC, представляет собой зрелую мегакариоцитарную клетку. В результате эндомитоза эта клетка становится полиплоидной. Далее справа представлена структура с длинными цитоплазматическими отростками, образующимися из полиплоидного ядра зрелой мегакариоцитарной клетки. В крайней правой части рисунка изображены многочисленные тромбоциты, образовавшиеся путем фрагментации цитоплазматических отростков.

Далее перечислены некоторые важные публикации, имеющие отношение к изложенному описанию созревания мегакариоцитов и образования тромбоцитов:

1. Williams, N and Levine, R. F., British Journal of Haematology 52: 173 - 180(1982).
2. Levin, J., Molecular Biology and Differentiation of Megakaryocytes, pub. Wiley-Liss, Inc.: 1 - 10(1990).
3. Gewirtz, A. M., The Biology of Hematopoiesis, pub. Wiley-Liss, Inc.: 123 - 132(1990).
4. Han, Z. C., et al., Int. J. Hematol. 54: 3 - 14(1991).
5. Nieuwenhuis, H, K. and Sixma, J., New Eng. J. of Med. 327: 1812 - 1813(1992).
6. Long, M., Stem Cells 11: 33 - 40(1993).

В. Регуляция образования тромбоцитов

Большое количество данных, полученных в различных лабораториях, указывает на то, что образование тромбоцитов регулируется гуморальными факторами. Сложность этого биологического процесса первоначально недооценивалась, но в настоящее время стало очевидно, что ряд человеческих ростовых факторов обладает такой способностью.

Регуляция роста мегакариоцитов происходит на нескольких клеточных уровнях. Некоторые цитокины усиливают образование тромбоцитов посредством увеличения пула клеток-предшественников. Другая группа гуморальных ростовых факторов служит факторами созревания, действуя на более дифференцированные клетки и ускоряя эндоредупликацию. Кроме того, в регуляции этих процессов

имеются две независимые петли обратной связи.

Несколько групп неспецифических гематопоетических ростовых факторов оказывают важное воздействие на созревание МК.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор(GM-CSF), интерлейкин-3(IL-3), IL-6, IL-11, фактор подавления лейкоза(LIF) и эритропоэтин(EPO) независимо и индивидуально ускоряют созревание МК in vitro, о чем судят по размеру МК, их числу и плоидности. Воздействие LIF, IL-6 и IL-11 на созревание МК частично(LIF и IL-6) или полностью(IL-11) дополняет таковое действие IL-3. Данные приведенных ниже публикаций дают основание считать, что для усиления созревания МК in vivo может быть необходимо сочетание цитокинов.

Далее перечислены некоторые основные публикации, посвященные регуляции образования мегакариоцитов и тромбоцитов.

7. Hoffman, R. et al., Blood Cells 13: 75 - 86(1987).

8. Murphy, M. J., Hematology/Oncology Clinics of North America 3(3): 465 - 478(1988).

9. Hoffman, R., Blood 74(4): 1196 - 1212(1989).

10. Mazur, E. M. and Cohen, J. L., Clin. Pharmacol. Ther., 46(3): 250 - 256(1989).

11. Gewirtz, A. M. and Calabretta, B., Int. J. Cell Cloning 8: 267 - 276(1990).

12. Williams, N., Progress in Growth Factor Research 2: 81 - 95(1990).

13. Gordon, M. S. and Hoffman, R., Blood 80(2): 302 - 307(1992).

14. Hunt, P. et al., Exp. Hematol. 21: 372 - 381(1993).

15. Hunt, P. et al., Exp. Hematol. 21: 1295 - 1304(1993).

Сообщалось также о том(см. ссылку 16), что человеческая апластическая сыворотка содержит мегакариоцитарную колониестимулирующую активность, отличную от IL-3, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и факторов, присутствующих в кондиционированной среде лимфоцитов. Однако обуславливающие эту активность молекулы не выделены и не охарактеризованы до настоящего времени.

16. Mazur, E. M., et al., Blood 76:290 - 297(1990).

С. Рецептор Mpl

Миелопролиферативный лейкозный вирус(MPLV) - это дефектный по репликации ретровирус мышей, вызывающий у инфицированных им млекопитающих острый лейкоз. Показано, что экспрессируемый MPLV ген состоит из фрагмента гена, кодирующего ретровирусный поверхностный белок, соединенного с последовательностью, родственной рецепторам цитокинов, включая рецепторы GM-CSF, G-CSF и EPO.

Экспрессия указанного гена MPLV в мышинных клетках-предшественниках различных типов приводит к быстрому приобретению независимости от ростовых факторов, которые в норме необходимы для пролиферации и конечного созревания. Кроме того, тот факт, что в некоторых культурах костномозговых клеток, трансформированных MPLV, обнаруживаются мегакариоциты, указывает на связь между геном MPLV и ростом и дифференцировкой мегакариоцитов.

В настоящее время показано, что вирусный ген MPLV(обозначенный как v-Mpl) имеет гомолог в клетках млекопитающих, который назван клеточным геном Mpl(или c-Mpl). С использованием проб на основе v-Mpl удалось проклонировать кДНК, соответствующую человеческому c-Mpl гену [см. опубликованную заявку РСТ 92/07074, публ. 30 апреля 1992]. Анализ последовательностей показал, что белок, кодируемый геном c-Mpl, принадлежит к высококонсервативному суперсемейству рецепторов цитокинов, также как и гомологичный продукт гена v-Mpl.

Вывод о функциональной роли клеточного гена c-Mpl в гематопозе основывается на данных о том, что его экспрессия обнаруживается в костном мозге, селезенке и эмбриональной печени нормальных мышей, но не в других тканях. В частности, c-Mpl экспрессируется в мегакариоцитах. Показано также, что человеческий c-Mpl экспрессируется в CD34-положительных клетках, включая очищенные мегакариоциты и тромбоциты. CD34 - это антиген, характерный для ранних кроветворных клеток-предшественников. Кроме того, обработка CD34-положительных клеток синтетическими олигонуклеотидами, антисмысловыми по отношению к c-Mpl мРНК, значительно подавляет колониобразующую способность CFU-МК мегакариоцитарных предшественников, но не оказывает эффекта на эритроидные и гранулоцитарно-макрофагальные предшественники.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что c-Mpl кодирует молекулу клеточной поверхности, обозначенную как Mpl-рецептор. Связывание лиганда активирует рецептор и, вероятно, приводит к образованию и/или развитию мегакариоцитов.

Опубликованная заявка РСТ 92/07074 относится к последовательности белка, кодируемого геном c-Mpl как человека, так и мыши. Продукт этого гена, который, как упоминалось, является рецептором, состоит по меньшей мере из трех областей или доменов: внеклеточного домена, трансмембранного домена и внутриклеточного(или цитоплазматического) домена. Соединенные вместе, эти домены составляют интактный рецептор Mpl. В упомянутой публикации РСТ также говорится о растворимой форме рецептора, которая в значительной степени соответствует внеклеточному домену зрелого белка c-Mpl. Внутриклеточный домен содержит гидрофобную область, и при соединении ее через трансмембранный домен с внеклеточным доменом весь белок становится нерастворимым. С другой стороны, когда внеклеточный домен продукта гена c-Mpl отделен от трансмембранного и внутриклеточного доменов, белок становится растворимым, поэтому внеклеточная форма белка обозначена как "растворимая" форма рецептора.

Ниже перечислены основные публикации, посвященные рецепторам v-Mpl и c-Mpl и их генам.

17. Wendling, F., et al., Leukemia 3(7): 475 - 480(1989)

18. Wendling, F., et al., Blood 73(5): 1161 - 1167(1989)
19. Souyri, M., et al., Cell 63: 1137 - 1147(1990)
20. Vigon, I., Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 5640 - 5644(1992)
21. Skoda, R. C., et al., The EMBO Journal 12(7): 2645 - 2653(1993)
22. Ogawa, M., Blood 81(11): 2844 - 2853(1993)
23. Methia, N., et al., Blood 82(5): 1395 - 1401(1993)
24. Wendling, F., et al., Blood 80: 246a(1993)

Р. Потребность в агенте, способном стимулировать образование тромбоцитов

Имеются сообщения о том, что переливание тромбоцитов производят все в большем числе случаев в медицинских центрах Северной Америки, Западной Европы и Японии [см. Gordon, M. S. и Hoffman, R., Blood 80(2): 302 - 307(1992)]. Это в значительной степени обусловлено усовершенствованием медицинских методов и распространением новых технологий в сердечной хирургии, а также пересадок костного мозга, сердца и печени. Увеличение доз химиопрепаратов при терапии раковых больных и распространение HIV-1 инфекции также внесли свой вклад в возрастающую потребность в тромбоцитах.

Переливание тромбоцитов несет с собой возможность распространения многих заболеваний, передающихся с кровью, а также возможность аллоиммунизации. Кроме того, получение очищенных тромбоцитов - процедура дорогостоящая и все более частое ее применение ведет к возрастанию общих медицинских расходов. Поэтому существует острая необходимость в новых усовершенствованных методах получения тромбоцитов для переливания людям.

Далее приведены некоторые примеры экспериментальных подходов к увеличению образования тромбоцитов.

В патенте США №5,032,396 описана способность интерлейкина-7(IL-7) стимулировать образование тромбоцитов. Интерлейкин-7, известный также как лимфопоэтин-1, это лимфопоэтический ростовой фактор, стимулирующий рост предшественников Т- и В-клеток в костном мозге. В опубликованной заявке [РСТ 88/03747, подана 19 октября 1988 и в заявке на Европейский патент 88309977.2, подана 24 октября 1988] описаны ДНК, векторы и необходимые способы для получения IL-7 млекопитающих методами генетической инженерии. Данные, представленные в патента США, свидетельствуют о том, что IL-7 может увеличивать число циркулирующих тромбоцитов у нормальных и сублетально облученных мышей.

В патенте США №5,087,448 показано, что мегакариоциты и тромбоциты млекопитающих можно стимулировать к пролиферации при помощи интерлейкина-6(IL-6). Рекомбинантный человеческий IL-6 представляет собой гликопротеин с мол.массой 26,000, обладающий несколькими биологическими активностями. Представленные в этом патенте данные указывают на то, что IL-6 увеличивает образование мегакариоцитарных колоний в тестах *in vitro*.

Ни в одном из процитированных патентов не упоминаются Mpl-лиганды, описанные в настоящем изобретении.

Несмотря на упомянутые достижения, потребность в новых стимуляторах мегакариоцитов и/или тромбоцитов у млекопитающих остается весьма острой.

Е. Предпосылки получения химически модифицированного MGDF

Белки для терапевтического применения в настоящее время доступны в значительных количествах и приемлемых формах в основном благодаря достижениям технологии рекомбинантных ДНК. Химические модификации таких белков могут эффективно предотвращать физический контакт протеолитических ферментов с собственно белковым каркасом, тем самым препятствуя деградации. При определенных условиях могут проявиться и такие преимущества, как увеличение стабильности и времени циркуляции терапевтического белка и уменьшение его иммуногенности. Однако, необходимо подчеркнуть, что эффект модификации в отношении каждого конкретного белка трудно предсказать. Френсисом опубликована обзорная статья, посвященная модификации белков, в том числе и слитных [Focus on Growth Factors 3: 4-10(May, 1992)(опубликовано Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London N20, OLD UK)].

Полиэтиленгликоль("ПЭГ", "пэг" или PEG)-одно из химических веществ, применяемых для приготовления фармакологических форм терапевтических белков. Например, Адаген-Р, препарат пэгированной аденозиндезаминазы, рекомендован для лечения острого комбинированного иммунодефицита; пэгированная супероксиддисмутаза проходит клинические испытания для лечения повреждений головы; пэгированный альфа-интерферон прошел фазу I клинических испытаний для лечения гепатита; пэгированная глюкоцереброзидаза и пэгированный гемоглобин находятся на стадии доклинических испытаний. Для некоторых белков показано, что прикрепление полиэтиленгликоля защищает от протеолиза [Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137:139(1991)], и известны методы присоединения полиэтиленгликоля [см. Патент США №4,179,337, Davis et al., "Неиммуногенные полипептиды", выданный 18 декабря 1979, и Патент США №4,002,531, Royer "Модификация ферментов полиэтиленгликолем, и продукты этого процесса", выданный 11 января 1977]. В качестве обзора [см. Abuchowski et al., in Enzymes as Drugs(J. S. Holcberg and J. Roberts, eds. pp. 367 - 383(1981))].

Для модификации белков используют и другие водорастворимые полимеры, такие как сополимер полиэтиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, кополимер этилен/малеиновый ангидрид и полиаминокислоты(как гомополимеры, так и случайные сополимеры).

Ряд подходов был использован для присоединения молекул полиэтиленгликоля к белку. Обычно молекулы полиэтиленгликоля присоединяют к белку посредством одной из активных групп белка. Подходящими для такого присоединения являются аминогруппы, например аминогруппы остатков лизина или аминогруппы N-конца. Например, Ройер [Патент США №4,002,531] использовал восстанавливающее

алкилирование для присоединения молекул полиэтиленгликоля к ферменту. В Европейском патенте №0539167 на "Имидаты ПЭГа и их белковые производные", опубликованном 28 апреля 1993г., Райт описывает пептиды и органические соединения со свободной аминогруппой(группами), модифицированными имидатными производными ПЭГа или другими водорастворимыми органическими полимерами. В Патенте США №4,904,584, выданном 27 февраля 1990г., Шоу описывает модификацию остатков лизина в белках для присоединения молекул полиэтиленгликоля через реактивные аминогруппы.

Один из терапевтических белков, который был химически модифицирован, это - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, "G-CSF" [см. EP №0401384, EP №0473268 и EP №0335423].

Другим примером служит пэгированный IL-6 [см. Европейский патент №0442724, озаглавленный "Модифицированный hIL-6", а также родственную заявку U. S. 07/632,070, в которой описаны молекулы полиэтиленгликоля, присоединенные к IL-6. В Европейском патенте №0154316, опубликованном 11 сентября 1985, описано взаимодействие лимфокина с альдегидом полиэтиленгликоля].

Возможность модификации MGDF неизвестна, поскольку она определяется специфическими структурными параметрами каждого конкретного белка. Кроме того, непредсказуемо воздействие такой модификации на биологические свойства отдельного белка. В силу многочисленных клинических применений MGDF, описанных в настоящей заявке, было бы желательно получить производное этого белка с измененными свойствами. Подобные молекулы могли бы иметь увеличенное время полужизни и/или усиленную активность *in vivo*, наряду с другими свойствами.

Пэгирование белка обычно приводит к образованию смеси молекул химически модифицированного белка. Например, молекулы белка с пятью остатками лизина и свободной аминогруппой на N-конце при пэгировании по описанному методу могут образовать гетерогенную смесь, в которой некоторые молекулы белка будут иметь шесть присоединенных молекул ПЭГа, некоторые - пять, некоторые - четыре или три, или две, или одну, или вообще ни одной.

При этом полиэтиленгликолевые группы могут быть присоединены к различным молекулам белка в различных участках.

Часто желательно получить гомогенный продукт, содержащий по существу всего одну или небольшое число(2 - 3) форм модифицированного белка, отличающихся числом и/или локализацией полиэтиленгликолевых групп. Однако, при некоторых терапевтических показаниях могут быть желательны или пригодны смеси моно-, ди- и/или три-пэгированных форм.

Непостоянство смеси от партии к партии является недостатком при разработке терапевтического пэгированного белка. В этом случае важна предсказуемость биологической активности. Например, показано, что при неселективной конъюгации супероксиддисмутазы с полиэтиленгликолем отдельные фракции модифицированного фермента оказываются полностью неактивными [P. McGoff et al., Chem. Pharm. Bull. 36:3079 - 3091(1988)]. [См. также Rose et al., Bioconjugate Chemistry 2: 154 - 159(1991)], которыми показано селективное прикрепление линкерной группы карбоксигидразида к C-концу карбоксильной группы белкового субстрата(инсулина). Если терапевтический белок непостоянен по составу от партии к партии, предсказуемость его свойств недостижима. Отдельные молекулы полиэтиленгликоля в определенных участках могут быть прикреплены слабее, чем в других, что может приводить к диссоциации ПЭГа и белка. Очевидно, если молекулы ПЭГа случайным образом присоединены к белку и диссоциируют также случайно, фармакокинетику терапевтического белка точно предсказать невозможно.

Также весьма желательным было бы получить такое производное MGDF, в котором бы отсутствовало соединительное звено между полимером и белком. Одна из проблем, связанных с применением описанных выше методов, состоит в том, что обычно требуется некое соединительное звено между белком и молекулой полиэтиленгликоля. Это соединительное звено может быть антигеном, что также является недостатком при разработке терапевтического препарата белка.

Методы без участия соединительных групп описаны [Fransis et al., в кн. "Стабильность белковых фармацевтических препаратов: пути деградации *in vivo* и стратегия стабилизации белков"(Ed. Ahern, T. and Manning, M. C.) Plenum, New York, 1991]. [См. также Delgado et al., "Соединение ПЭГа с белком путем активации с трезил-хлоридом, применения в иммуноаффинных клеточных препаратах и Fisher et al., ред., Разделение с использованием систем с водной фазой, Применение в клеточной биологии и биотехнологии, Plenum Press, N. Y., 1989, стр. 211 - 213], где описано использование трезил-хлорида, что приводит к отсутствию соединительных групп между полиэтиленгликолем и белком. Данный метод трудно применить для получения терапевтических препаратов, поскольку использование трезил-хлорида приводит к образованию токсичных побочных продуктов.

[Chamow et al., Bioconjugate Chem. 5: 133 - 140(1994)] описали модифицирование CD4-иммуноадгезина альдегидом моно-метокси полиэтиленгликоля("MePEG") посредством восстановительного алкилирования. Авторы сообщают, что 50% CD4-Ig было модифицировано MePEG при селективной реакции по альфа-аминогруппе N-конца [см. цит. источник, стр. 137]. Авторы также сообщают, что способность модифицированного CD4-Ig связываться *in vivo* с белком gp120 уменьшалась в зависимости от степени связывания с MePEG.

Таким образом, имеется потребность в производных MGDF, в частности в пэгированном MGDF. Существует также необходимость разработки способов получения подобных производных.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении заявлены новые полипептиды, специфически усиливающие рост и/или развитие мегакариоцитов("Mpl-лиганды" или "MGDFs"), которые, по существу, свободны(т. е. очищены) от других белков(т. е. белков млекопитающих в случае Mpl-лигандов, получаемых из соответствующих

источников). Эти белки могут быть выделены из клеток, продуцирующих факторы естественным образом или в силу индукции другими факторами. Они могут также быть получены методами генетической инженерии. Кроме того, Mpl-лиганды могут быть синтезированы химическими методами или получены при комбинировании описанных подходов.

Заявленные в настоящем изобретении Mpl-лиганды могут быть получены в нативном виде из клеток и тканей млекопитающих. В разделе Примеров настоящей заявки описаны два Mpl-лиганда, выделенные из апластической плазмы собак. Однако, как описано в других Примерах настоящей заявки, близко родственные Mpl-лиганды присутствуют в апластической плазме человека и свиньи. Примечательно, что активность человеческого, свиного и собачьего Mpl-лиганда специфически подавляется растворимой формой мышинового Mpl-рецептора, что свидетельствует о сильном сходстве этих Mpl-лигандов как в отношении структуры, так и в отношении функции.

Mpl-лиганды человека, свиньи и других млекопитающих могут быть выделены из природных источников методами, описанными в настоящей заявке(см. Пример 10). Таким образом, настоящее изобретение включает в себя Mpl-лиганды млекопитающих, т. е. собаки, свиньи, человека, мыши, лошади, овцы и кролика. Особенно предпочтительными являются Mpl-лиганды собаки, свиньи и человека.

Кроме того, гены, кодирующие Mpl-лиганды человека, были клонированы из библиотек эмбриональных почки и печени. Эти гены просеквенированы, как описано в разделе Примеров настоящей заявки. Показано, что две полипептидные последовательности человека обладают активностью в клеточных тестах(см. Пример 4). Они отличаются по длине, однако идентичны в значительной части своих аминокислотных последовательностей. Одинаковые участки имеют гомологию с эритропоэтином. Mpl-лиганды обозначаются и как факторы роста и развития мегакариоцитов(MGDFs); все указания на Mpl-лиганды имеют такое же отношение и к MGDFs, и наоборот. "Полипептид MGDF" означает полипептид, обладающий способностью специфически стимулировать или ингибировать рост и/или развитие мегакариоцитов. Примеры подобных полипептидов приведены в настоящей заявке.

Описанные в настоящем изобретении Mpl-лиганды проявляют специфическую активность по отношению к мегакариоцитарному росту кроветворения, усиливая созревание и/или пролиферацию мегакариоцитов, как это показано в Примерах 2 и 4 далее. Термин "специфически" означает, что биологическая активность полипептидов проявляется в значительной степени в отношении мегакариоцитов, нежели в отношении клеток других типов. Те факторы, которые обладают стимулирующим воздействием на мегакариоциты, имеют *in vivo* активность, стимулирующую образование тромбоцитов. Происходит это посредством стимуляции созревания и дифференцировки мегакариоцитов.

Два предпочтительных Mpl-лиганда собачьего происхождения имеют молекулярные массы около 25кД и 31кД, как определено электрофорезом в полиакрилмидном геле с додецилсульфатом натрия(SDS-PAGE) в невосстанавливающих условиях. Оба белка были очищены по одной и той же методике, приведенной в разделе Примеров.

Два предпочтительных лиганда человеческого происхождения, MGDF-1 и MGDF-2, состоят соответственно из 332 и 174 аминокислот и не включают 21 аминокислоту предполагаемого сигнального пептида.

Другим аспектом настоящего изобретения являются процессы выделения и очистки указанных Mpl-лигандов или их фрагментов из природных источников, предпочтительно цельной крови, сыворотки или плазмы млекопитающих. В качестве исходного материала наиболее предпочтительны апластические кровь, сыворотка или плазма. Они могут быть получены с использованием процедуры облучения млекопитающих, например, дозой около 400 - 800рад с помощью кобальта-60 и, что делает данных животных апластичными. Подобная процедура хорошо известна, как видно из публикаций, процитированных в Примере 1. В случае человека апластические кровь, сыворотка или плазма могут быть получены от пациентов, проходящих радиотерапию, например, при онкологических заболеваниях.

Затем апластические кровь, сыворотка или плазма подвергаются процессу очистки. Заявленный в настоящем изобретении процесс очистки состоит из нескольких ключевых этапов: аффинной хроматографии с лектином и аффинной хроматографии с Mpl-рецептором. Каждый из этих этапов дает приблизительно 300 - 500-кратную очистку 25кД и 31кД белков из апластической плазмы собаки. Другие стандартные методы очистки белков могут быть использованы вместе с указанными для дальнейшей очистки Mpl-лигандов, как это описано ниже.

Другим аспектом настоящего изобретения являются полинуклеотиды, кодирующие белок Mpl-лиганда млекопитающих. Такие последовательности ДНК могут включать выделенные последовательности ДНК, которые направляют экспрессию белков Mpl-лигандов млекопитающих, как это описано далее. Эти последовательности ДНК могут также включать 5' и 3' некодирующие последовательности млекопитающих, ланкирующие кодирующие последовательности Mpl-лигандов. Кроме того, последовательности ДНК могут кодировать аминотерминальный сигнальный пептид. Подобные последовательности могут быть получены любым из известных методов, включая полный или частичный химический синтез. Кодоны могут быть оптимизированы для экспрессии в определенном хозяине(например, *E. coli* или клетках CHO).

В настоящем изобретении также заявлены рекомбинантные молекулы ДНК, каждая из которых представляет собой векторную ДНК, соединенную с последовательностями ДНК, кодирующими Mpl-лиганд млекопитающих. В этих рекомбинантных молекулах ДНК Mpl-лиганда функционально соединена с регуляторной последовательностью, обеспечивающей репликацию и экспрессию Mpl-лиганда в определенных клетках-хозяевах. Клетки-хозяева(например, бактерий, насекомых, млекопитающих, дрожжей или растений), трансформированные такими молекулами ДНК с целью экспрессии

рекомбинатного белка Mpl-лиганда, также являются предметом данного изобретения.

Молекулы ДНК и трансформированные клетки, заявленные в настоящем изобретении, могут быть использованы для получения рекомбинатного белка Mpl-лиганда млекопитающих или его фрагментов. Клеточную линию, трансформированную последовательностями ДНК, кодирующими Mpl-лиганд или его фрагмент(или упомянутыми выше рекомбинантными молекулами ДНК) в функциональной ассоциации с подходящими регуляторными последовательностями, культивируют в соответствующих условиях, обеспечивающих экспрессию рекомбинантной ДНК. В этом процессе многие клеточные линии могут быть использованы в качестве клеток-хозяев для экспрессии белка. Предпочтительными для получения Mpl-лиганда являются клеточные линии млекопитающих(например, клетки CHO) и бактериальные клетки(например, *E. coli*).

Для получения Mpl-лиганда в клетках *E. coli* предпочтительно, чтобы на N-конце экспрессируемого белка находились остатки Met и Lys, поскольку в этом случае выход продукта экспрессии обычно выше. Человеческий MGDF насчитывает 165 аминокислот [т. е. Met-Lys, находящийся на N-конце 1-163 ФРДМ(ФРДМ-11) аминокислоты 1-163 последовательности SEQ ID№25]. После очистки продукта, экспрессированного в таких бактериальных клетках, как *E. coli*, терминальные Met-Lys остатки могут быть удалены обработкой какой-либо дипептидазой(например, катепсином С).

Экспрессированный белок Mpl-лиганда затем выделяют из клеток-хозяев, клеточного лизата или культуральной среды одним из обычных методов. Кондиционированная среда может быть подвергнута тем же этапам очистки(или их модификациям) Mpl-лиганда, что и апластическая плазма.

Другим предметом настоящего изобретения являются рекомбинантные Mpl-лиганды. Эти белки, по существу, свободны от других биологических структур животного происхождения, в особенности белков. Заявленные в настоящем изобретении Mpl-лиганды характеризуются одной или более физической, биохимической, фармакологической или биологической активностями. Данные активности описаны в заявке.

В настоящем изобретении также заявлен химически модифицированный MGDF, состоящий из собственно белка MGDF, соединенного по меньшей мере с одним водорастворимым полимером, а также методы получения и применения таких композиций. В частности, заявлен такой химически модифицированный MGDF, в котором посредством реакции с полиэтиленгликолем к MGDF присоединяется ПЭГ. Подобное соединение может быть достигнуто такими описываемыми ниже реакциями пэгирования, как ацилирование или алкилирование. Ацилирование или алкилирование с ПЭГом могут проводиться в таких условиях, при которых конечный продукт будет монопэгирован или полипэгирован. При полипэгировании обычно происходит прикрепление ПЭГа к эпсилон-аминогруппам остатков лизина, при этом также возможно пэгирование N-конца белка. При монопэгировании предпочтительно происходит присоединение ПЭГа к альфа-аминогруппе N-конца белка. Выход и гомогенность продукта реакции монопэгирования могут быть увеличены посредством такого восстанавливающего алкилирования, при котором селективно модифицируется альфа-аминогруппа N-конца белка MGDF, тем самым обеспечивая избирательное прикрепление водорастворимого полимера к N-концу белка. Такой подход позволяет получать преимущественно гомогенные препараты конъюгата полимер/MGDF-белок, так же как и(в случае использования ПЭГа) препараты пэгированного белка MGDF, в которых полиэтиленгликоль непосредственно соединен с белком.

В настоящем изобретении также заявлены фармацевтические препараты(композиции), содержащие терапевтически эффективное количество очищенного природного или рекомбинантного Mpl-лиганда, который может быть модифицирован таким водорастворимым полимером, как полиэтиленгликоль, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, растворителем или буфером. Данные фармацевтические препараты могут быть использованы для лечения таких болезненных состояний или расстройств, которые характеризуются недостатком мегакариоцитов и/или тромбоцитов, также как и недостатком Mpl-лиганда *in vivo*. Они могут также использоваться профилактически для компенсации ожидаемой потери мегакариоцитов или тромбоцитов(например, при хирургических операциях).

Таким образом, заявленные в настоящем изобретении Mpl-лиганды могут применяться для лечения апластических анемий, например, для усиления образования тромбоцитов у больных(скажем, у больных СПИДом или у больных, подвергнутых химиотерапии опухолей). Mpl-лиганд может быть использован для лечения таких нарушений кроветворения, как тромбоцитопения. Mpl-лиганд может стать частью сочетанной терапии больных, перенесших трансплантацию костного мозга. Ими могут быть люди или другие млекопитающие. Mpl-лиганд, полученный от одного биологического вида, может применяться для больных другого биологического вида.

Другим предметом настоящего изобретения является способ лечения других патологических состояний, характеризующихся недостатком тромбоцитов, путем введения больному терапевтически эффективного количества описанного выше фармацевтического препарата. Подобные терапевтические методы могут предусматривать введение одновременно с Mpl-лигандом или последовательно эффективного количества по меньшей мере одного мегакариоцитарного колониестимулирующего фактора, цитокина(например, EPO), растворимого Mpl-рецептора, гематопозтина, интерлейкина, ростового фактора или антител.

В настоящем изобретении заявлены также антитела(поликлональные, моноклональные, гуманизированные или рекомбинантные), а также фрагменты антител, полученные(т. е. реагирующие) против Mpl-лиганда млекопитающих или его фрагмента. Соответственно, в настоящее изобретение включены клетки, способные секретировать такие антитела(т. е. гибридомы в случае моноклональных антител), методы получения таких антител и их применения в диагностических и терапевтических целях.

Другим предметом настоящего изобретения является способ определения Mpl-лиганда в жидкостях организма. При этом могут быть использованы антитела, специфически распознающие Mpl-лиганд, как в "сэндвич"-варианте, так и сами по себе. Подобный подход может быть использован для определения необходимости введения больному Mpl-лиганда и/или выявления у данного больного недостаточности тромбоцитов. Реагенты для постановки подобных тестов могут быть собраны в набор, включающий положительный и отрицательный контроли, антитела и другие стандартные компоненты таких наборов.

Другие аспекты и преимущества заявленного изобретения станут очевидными из последующего подробного описания вариантов его осуществления.

Краткое описание рисунков

Многочисленные преимущества настоящего изобретения будут более очевидны при рассмотрении следующих чертежей:

фиг.1 отражает развитие и созревание мегакариоцитов и тромбоцитов;

фиг.2 показывает, что растворимый мышинный Mpl-рецептор практически полностью подавляет способность плазмы облученных собак ("апластическая собачья" или "APK9") индуцировать развитие мегакариоцитов. Тест на развитие мегакариоцитов описан в Примере 2;

фиг.3 показывает, что активность APK9, обогащенная аффинной хроматографией с лектином и аффинной хроматографией с Mpl-рецептором ("Mpl-лиганд"), стимулирует рост клеток 1A6.1 и что растворимый мышинный Mpl-рецептор блокирует этот рост;

фиг.4 приводит обзор этапов очистки 25кД и 31кД форм Mpl-рецептора собаки из апластической плазмы собаки;

фиг.5 показывает очистку Mpl-лиганда обратно-фазовой хроматографией высокого разрешения (RP-HPLC). Во фракции 21 содержится высокоочищенный 31кД Mpl-лиганд; фракция 22 содержит смесь 31кД и 25кД Mpl-лиганда; фракция 23 содержит высокоочищенный 25кД Mpl-лиганд;

фиг.6 показывает сравнение активностей Mpl-лиганда во фракциях, полученных RP-HPLC (колонок C4) и содержащих 25кД и/или 31кД белки Mpl-лиганда;

фиг.7 отражает количество мегакариоцитов, образовавшихся в культурах CD34-положительных клеток периферической крови, стимулированных APK9, Mpl-лигандом и различными другими факторами;

фиг.8 отражает общее количество лимфоцитов, образовавшихся в культурах CD34-положительных клеток периферической крови, стимулированных APK9, Mpl-лигандом и различными другими факторами;

фиг.9 отражает процент мегакариоцитов, образовавшихся в культурах CD34-положительных клеток периферической крови, стимулированных APK9, Mpl-лигандом и различными другими факторами;

фиг. 10 показывает, что IL-3 человека не участвует в индуцированном Mpl-лигандом развитии мегакариоцитов;

фиг.11 представляет последовательности кДНК и предсказанные аминокислотные последовательности MGDF-1 и MGDF-2 человека;

фиг.12 представляет последовательность кДНК и предсказанную аминокислотную последовательность MGDF-3 человека;

фиг.13 демонстрирует сравнение MGDF-1 и MGDFs (Mpl-лигандов) собачьего (A) и мышинного (B) происхождения;

фиг.14 показывает пример ацилирования MGDF с использованием N-гидроксисукцинимидил (NHS) активных эфиров монометокси-полиэтиленгликоля для получения полипэгированного продукта;

фиг.15 показывает пример неспецифического восстановительного алкилирования MGDF с использованием альдегидов монометокси-полиэтиленгликоля для получения полипэгированного продукта;

фиг. 16 показывает пример сайт-специфического восстановительного алкилирования MGDF по альфа-аминогруппе N-терминального остатка с использованием альдегидов моно-метоксиполиэтиленгликоля для получения, по существу, монопэгированного продукта;

фиг.17 демонстрирует HPLC анализ на основании исключения по размерам (SEC HPLC) конъюгатов MePEG-MGDF, полученных с применением активированных производных MePEG с мол. весом 20кД;

А. поли-MePEG-MGDF-конъюгат, полученный путем ацилирования MGDF NHS-эфиром MePEG(PEG11);

Б. поли-MePEG-MGDF-конъюгат, полученный путем алкилирования MGDF MePEG альдегидом (PEG 20);

В. поли-MePEG-MGDF-конъюгат, полученный путем алкилирования MGDF альдегидом MePEG (PEG 16).

фиг 18 показывает количество тромбоцитов у мышей, получавших рекомбинантный MGDF человека: незакрашенные звездочки - MGDF 22-353, полученный в клетках CHO; незакрашенные кружки - непэгированный MGDF 22-184, полученный в E. coli (т.е. MGDF 1-163); закрашенные кружки - пэгированный MGDF 22-184, полученный в E. coli;

фиг. 19 демонстрирует схему очистки r-HuMGDF.

фиг.20 на модели мышей показывает влияние r-HuMGDF (E. coli 1-163) на количество тромбоцитов. В день 0 мышам Balb/c интраперитонеально однократно вводили карбоплатин (1,25мг/мышь). Контрольной группе мышей вводили растворитель вместо карбоплатина. Через 24 часа животным, обработанным карбоплатином, подкожно вводили растворитель или 100 кг/кг r-HuMGDF. Инъекции проводили ежедневно до конца эксперимента (n = 10 для каждой группы; в каждой временной точке кровь брали у пяти животных);

фиг.21 показывает воздействие r-HuMGDF (E.coli 1-163) на количество тромбоцитов у облученных мышей. В день 0 мыши Balb/c получали однократную дозу 500рад гамма-облучения (цезиевый источник).

Контрольная группа мышей облучению не подвергалась. Через 24 часа облученным животным подкожно вводили растворитель или 100мкг/кг r-HuMGDF. Инъекции проводили ежедневно до конца эксперимента (n = 8 для каждой группы; в каждой временной точке кровь брали у пяти животных) ;

фиг.22 показывает воздействие r-HuMGDF (E. coli 1-163) на количество тромбоцитов у мышей, подвергавшихся комбинированному воздействию облучения и карбоплатина. В день 0 мыши Balb/c получали однократную дозу 500рад гамма-облучения (цезиевый источник) и однократную дозу карбоплатина (1,25мг/мышь). Через 24 часа обработанным животным подкожно вводили растворитель или 100мкг/кг r-HuMGDF. Инъекции проводили ежедневно до конца эксперимента (n = 8 для каждой группы). Большинство животных, не получавших r-HuMGDF, не выжило. В контрольной группе выжило 1 животное из восьми. В опытной группе выжило 8 животных из 8;

фиг.23 показывает воздействие r-HuMGDF (E. coli 1-163) на вызванную облучением тромбоцитопению у макаков резус. Обезьяны получали дозу облучения 700сGy, Co-80. В течение 18 дней спустя 24 часа после облучения животным вводили подкожно r-HuMGDF (n = 3) или сывороточный альбумин человека (n = 9) (каждый в дозе 25мкг/кг/день). Анализ клеток крови проводили при помощи электронного анализатора. Каждый значок представляет среднее значение (+/- среднее отклонение) ;

фиг.24 показывает эффект пэгированного и гликозилированного r-HuMGDF на количество тромбоцитов у мышей, обработанных карбоплатином и облучением. Мыши были подвергнуты комбинированному воздействию карбоплатина и облучения, как это описано в эксперименте, представленном на фиг.22. Подкожные введения указанного препарата r-HuMGDF (50мкг/кг/день) производили ежедневно в течение всего эксперимента, начиная с 24 часов после исходной обработки. Подсчет клеток крови проводили в указанные дни с помощью электронного счетчика клеток (Sysmex, Baxter) ;

фиг.25 демонстрирует последовательность синтетического рекомбинантного MGDF человека (аминокислоты 1-163), имеющего кодоны, оптимизирующие экспрессию в E. coli.

Подробное описание изобретения

Дополнительные аспекты и преимущества изобретения станут более ясными для специалистов, работающих в данной области исследований, из приведенного ниже описания, которое раскрывает практические возможности использования изобретения.

Новые факторы, усиливающие рост мегакариоцитов млекопитающих, и/или факторы, продуцируемые тромбоцитами, обозначенные как Mpl-лиганды и полученные согласно настоящему изобретению, представляют собой гомогенные белки, практически свободные от других подобных белку соединений. Предпочтительно, чтобы целевые белки были на 90% свободны от других белков, более предпочтительно, чтобы на 95% и совсем предпочтительно, чтобы целевые белки были примерно на 98% и более свободны от других белков. Указанные белки могут быть получены в большом количестве с помощью рекомбинантной технологии таким образом, что конечный продукт представляет собой обладающие высокой степенью чистоты активные Mpl-лиганды, которые успешно могут быть использованы в терапии. Альтернативно, такие белки могут быть получены в гомогенной форме из апластической крови млекопитающих, плазмы или сыворотки, а также из клеточных линий млекопитающих, секретирующих или экспрессирующих Mpl-лиганд.

Более того, Mpl-лиганд или его активные фрагменты могут быть химически синтезированы. В целом, под термином "Mpl-лиганды", используемом в настоящем изобретении, подразумеваются как сами Mpl-лиганды, так и их активные фрагменты и варианты, которые более детально описаны ниже.

Два предпочтительных Mpl-лиганда собаки имеют молекулярную массу около 25кД и 31кД, определенную электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в невосстанавливающих условиях. Оба белка очищают согласно одной методике, которая более подробно описана в приведенных далее примерах. Так, например, оба Mpl-лиганда связывают лектин зародышей пшеницы и иммобилизуют Mpl-рецептор. Белок размером 25кД имеет следующую аминокислотную последовательность:

Ala-Pro-Pro-Ala-Xaa-Sap-Pro-Arg-Leu-Leu-Asn-Lys-Met-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His-Xaa-Arg-Leu-Xaa-Gln-Xaa-Pro-Asp-Ile-Tyr (SEQ ID NO : 1).

Белок размером 31кД имеет следующую аминокислотную последовательность:

Ala-Pro-Pro-Ala-Xaa-Asp-Pro-Arg-Leu-Leu-Asn-Lys-Met-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His (SEQ ID NO : 2).

Аминокислоты "Xaa" в последовательностях SEQ ID NO : 1 и 2 точно не определены, однако предположительно являются цистеином, серином, треонином или (менее вероятно) триптофаном. Из приведенных выше последовательностей видно, что лиганд размером 31кД содержит по крайней мере часть лиганда размером 25кД. В частности, первая 21 аминокислота белка 31кД точно совпадает с первой 21 аминокислотой белка 25кД. Это обстоятельство и в особенности тот факт, что оба белка проявляют активность в исследованиях свойств Mpl-лигандов, описанных в настоящем изобретении, позволяют сделать вывод о том, что оба белка очень тесно связаны между собой как по структуре, так и по функциям. Вероятно, что белковая форма размером 31кД отличается от белка размером 25кД структурой С-терминальной последовательности, а также иным характером гликозилирования и/или другим характером сплайсинга гена, кодирующего белки. В дополнение к описанным выше последовательностям в процессе секвенирования 25-кД полосы до конечной стадии очистки (при использовании обратноточной HPLC) была определена другая последовательность. Было показано, что указанная последовательность ассоциирована с полосой 25кД в невосстанавливающих условиях, но не в

восстанавливающих условиях, позволяя предположить, что она является результатом расщепления на два фрагмента(например, с помощью протеазы) 25-кД белка, причем эти фрагменты удерживаются вместе дисульфидной связью. Указанная последовательность имеет следующую структуру:

Thr-Gln-Lys-Glu-Gln-Thr-Lys-Ala-Gln-Asp-Val-Leu-Gly-Ala-Val-Ala-Leu(SEQ ID NO : 3).

Несмотря на то, что локализация последовательности SEQ ID NO : 3 в пределах последовательности 25-кД белка неизвестна, аналогия с другими цитокинами, такими как эритропоэтин, позволяет предположить, что указанная последовательность расположена вблизи 114-й аминокислоты белка размером 25кД. Следует отметить, что вероятно(однако не доказана) локализация последовательности SEQ ID NO : 3 и в пределах белка размером 31кД, при том, что она опять же начинается вблизи аминокислоты 114. Информация о данной последовательности более подробно обсуждается в Примере 7.

Благодаря первоначальным экспериментам по очистке лигандов собаки, описанным выше, был клонирован ген, кодирующий лиганд. В результате была определена полная аминокислотная последовательность указанного лиганда собаки, которая приведена на фиг.13А. На основании данных о молекулярной массе, предсказано, что лиганды собаки размером 25кД и 31кД являются С-терминальными процессорированными формами лиганда полной длины, чья последовательность приведена на фиг. 13А. В дополнение к этому получен Mpl-лиганд мыши, имеющий последовательность, приведенную на фиг.13Б. Такие очищенные лиганды также могут быть охарактеризованы согласно специфической активности, проявляемой в исследовании мегакариоцитов человека(Пример 2), которая составляет по крайней мере 5,7 миллиардов мегакариоцитарных единиц/мл. Мегакариоцитарную единицу определяют как количество материала, из которого можно получить столько мегакариоцитов, сколько из 1мкл контрольного АРК9 стандарта, как это показано при описании исследования в Примере 2.

Кроме того, такие очищенные лиганды могут быть охарактеризованы согласно специфической активности, проявляемой в исследовании Mpl-зависимого роста клеток(Пример 4), которая составляет по крайней мере 6,9 миллиардов единиц клеточного роста/мг. Единицу клеточного роста определяют как количество лиганда, необходимого для роста 200 клеток 1А6.1 в исследовании, описанном в Примере 4. В приведенной ниже Таблице 1 указаны дополнительные специфические показатели активности очищенных Mpl-лигандов собаки, полученных согласно данному изобретению:

Таблица 1

Mpl-лиганд	1А6.1 тест (ед/мг)	Определение мегакариоцитов человека (ед/мг)
31кД	6.52×10^9	5.7×10^9
25кД	10.5×10^9	14×10^9

Суммируя приведенную выше информацию, в качестве примеров могут быть охарактеризованы некоторые Mpl-лиганды на основании одного или более биохимических и биологических свойств:

- (а) такие Mpl-лиганды выделены из апластической плазмы;
- (б) такие Mpl-лиганды имеют молекулярную массу около 25кД или 31кД, как определено методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия(SDS-PAGE) в невозстанавливающих условиях;
- (в) Mpl-лиганды содержат следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO : 1 в случае белка мол. массы 25кД; или SEQ ID NO : 2 в случае белка мол. массы 31кД;
- (г) Mpl-лиганды дополнительно содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 3(особенно важно в случае белка мол. массы 25кД);
- (д) Mpl-лиганды связывают лектин зародышей пшеницы;
- (е) Mpl-лиганды связывают иммобилизованный растворимый Mpl-рецептор мыши;
- (ж) активность Mpl-лигандов может ингибироваться in vitro растворимым Mpl-рецептором; и
- (з) Mpl-лиганды связываются с анионообменной колонкой при pH около 8-9. Биологическая активность предпочтительных Mpl-лигандов, полученных согласно настоящему изобретению, подтверждена их способностью специфически стимулировать рост и развитие мегакариоцитов в исследовании усиления роста клеток, которое описывается в Примере 2. В указанном эксперименте Mpl-лиганды стимулируют дифференцировку CD34+ клеток периферической крови человека(то есть CD34-клеток, выделяемых иммуноадсорбцией) на протяжении 8 дней культивирования. Мегакариоциты идентифицируют окрашиванием с помощью специфических антител к антигену тромбоцитов и подсчитывают под микроскопом. Кроме того, Mpl-лиганд стимулирует рост фактор-зависимой клеточной линии 1А6.1. В отсутствие Mpl-лиганда клетки погибают. Число клеток в культуре, содержащей Mpl-лиганд, определяют через 2 дня. Mpl-лиганды, описанные выше, обладают специфической активностью, приведенной в Таблице 1(см. ранее).

Источниками Mpl-лигандов служат апластическая кровь млекопитающих, плазма крови или сыворотка. Однако, источники таких лигандов не ограничиваются указанными и могут включать другие жидкости тела млекопитающих, клетки, полученные из таких жидкостей и т. д. Очистка нативных Mpl-лигандов при выделении из указанных выше источников основана на двух основных процедурах:

- (а) аффинной хроматографии при использовании лектина, преимущественно агглютинаина зародышей пшеницы; и
- (б) аффинной хроматографии с иммобилизованным Mpl-рецептором. Дополнительные процедуры

могут включать дальнейшую очистку белка. К ним относятся, например, ионообменная хроматография, гельфильтрационная хроматография и обратно-фазовая хроматография.

Методика очистки, в действительности используемая для выделения Mpl-лиганда из апластической плазмы крови собаки, включает следующие стадии(см. Пример 7):

(а) лектин-аффинную хроматографию(особенно предпочтительна хроматография при использовании агглютинаина из зародышей пшеницы);

(б) аффинная хроматография при использовании растворимого Mpl-рецептора(Mpl-X)(особенно предпочтительно использование иммобилизованного Mpl-X мыши);

(в) ионообменная хроматография(катион- или анион-обменная хроматография, в особенности при использовании колонки Mono Q);

(г) гельфильтрационная хроматография в условиях, вызывающих диссоциацию(предпочтительно при использовании Superdex 200 и SDS); и

(д) обратно-фазовая хроматография(предпочтительно при использовании C4-колонки).

Гомогенный Mpl-лиганд млекопитающих, в том числе лиганд человека, может быть получен из апластической крови, сыворотки, плазмы или других источников Mpl-лиганда человека, например клеток или тканей при использовании описанной выше методики очистки. Необходимые этапы очистки не обязательно следуют в указанном порядке, однако приведенная последовательность соответствующих этапов является предпочтительной. Методики культивирования клеток или тканей, которые могут являться источником Mpl-лиганда, хорошо известны специалистам в данной области исследований и могут быть применены, например, для увеличения количества исходного материала.

Mpl-лиганд или же один или более его пептидных фрагментов могут быть получены и с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Для получения последовательности ДНК определенного Mpl-лиганда лиганд-содержащий материал концентрируют и обычно обрабатывают протеазой, такой как трипсин. Образовавшиеся в результате энзиматического расщепления фрагменты выделяют и секвенируют с помощью подходящего метода. Альтернативно, как показано в приведенных ниже примерах, интактный очищенный белок может быть секвенирован напрямую в той степени, которая достижима при данном доступном количестве белка, а затем секвенированная область может быть аналогичным образом использована для получения триптических фрагментов, согласно следующей методике. Синтезируют олигонуклеотидные пробы, используя генетический код для предсказания всех возможных последовательностей генов, кодирующих аминокислотные последовательности секвенированных фрагментов(или фрагмента). Предпочтительно, чтобы в качестве проб использовались некоторые вырожденные последовательности. Ген Mpl-лиганда идентифицируют при использовании указанных проб для скрининга геномной библиотеки млекопитающих или других источников. В противоположность этому, мРНК из клеток, являющихся источником Mpl-лиганда, может использоваться для получения библиотеки кДНК, которую скринируют с помощью проб для идентификации кДНК, кодирующей полипептид Mpl-лиганда. Более того, для наращивания кДНК-последовательности может быть использована полимеразная цепная реакция(ПЦР), в которой задействованы соответствующие праймеры.

Используя соответствующие пробы для скрининга геномной библиотеки, получают ДНК-клон. Для получения клона, содержащего полноразмерную копию гена Mpl-лиганда, пробы на основе полученной последовательности ДНК могут быть использованы для повторного скрининга библиотеки и гибридизации с полноразмерной последовательностью Mpl-лиганда.

кДНК Mpl-лиганда человека может быть также получена путем субклонирования полноразмерного геномного клона человека в векторе экспрессии, последующего переноса его в COS-клетки, получения библиотеки кДНК из указанных трансфицированных COS-клеток и скрининга кДНК Mpl-лиганда путем гибридизации. После идентификации полной последовательности кДНК, она сама или какой-либо ее участок, кодирующий активный фрагмент Mpl-лиганда, может быть встроен в любой из большого числа известных векторов экспрессии для получения системы экспрессии Mpl-лиганда или одного или более фрагментов.

При таком использовании рекомбинантной технологии предпочтительно получают ДНК-последовательности, определяющие синтез полипептидов Mpl-лиганда. Настоящее изобретение также относится к указанным последовательностям, которые свободны от ДНК-последовательностей, кодирующих другие белки(т. е. к изолированным последовательностям) и обеспечивают экспрессию полипептидов Mpl-лиганда с активностью Mpl-лиганда(т. е. полипептидов, вызывающих рост и/или развитие мегакариоцитов). Указанные ДНК-последовательности включают такие последовательности, которые кодируют весь или какой-либо фрагмент Mpl-лиганда, и такие последовательности, которые гибридизуются, предпочтительно в жестких гибридизационных условиях, с кДНК-последовательностями [C. M. Maniatis et al., *Molecular Cloning(A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), pp.387-389].

Обычно гибридизацию в жестких условиях проводят в 4 x SSC при 62 - 67°C с последующими отмывками в 0,1 x SSC при 62 - 67°C. Альтернативно, гибридизацию в жестких условиях проводят в 45 - 55%-ном формамиде, 4 x SSC при 40 - 45°C. ДНК-последовательности, которые гибридизуются с последовательностями Mpl-лиганда в мягких условиях и кодируют пептиды Mpl-лиганда, имеющие биологические свойства Mpl-лиганда, также кодируют новые полипептиды Mpl-лиганда, заявленные в настоящем изобретении. Обычно гибридизацию в мягких условиях проводят в 4 x SSC при 40 - 45°C или в 30 - 40%-ном формамиде при 40 - 45°C. Например, ДНК-последовательность, которая имеет участки существенной гомологии(скажем, области гликозилирования или дисульфидных связей) с последовательностями Mpl-лиганда и кодирует белок, обладающий одним или более видами

биологической активности Mpl-лиганда, явным образом кодирует полипептид Mpl-лиганда, даже если такая ДНК-последовательности и не будет гибридизоваться с последовательностью(последовательностями) Mpl-лиганда в жестких условиях.

Аллельные варианты(имеющие природное происхождение изменения оснований в генетических структурах организмов, образующих данную популяцию, которые не обязательно приводят к замене аминокислоты) ДНК-последовательностей, кодирующих пептидные последовательности Mpl-лиганда, тоже включены в объем настоящего изобретения, так же, как и аналоги и производные этих последовательностей. Аналогичным образом, ДНК-последовательности, которые кодируют полипептиды Mpl-лиганда, но различаются некоторыми кодонами вследствие вырожденности генетического кода, а также различные варианты последовательности ДНК Mpl-лиганда, которые обусловлены точечными мутациями или индуцированными модификациями для усиления активности, увеличения времени полужизни или повышения выхода полипептида, кодируемого такими модифицированными последовательностями, также включены в объем настоящего изобретения.

В результате процедуры клонирования, описанной ниже в Примере 11, определяют последовательность ДНК и последовательность аминокислот белков человека MGDF-1, MGDF-2 и MGDF-3, которые приведены здесь в материалах заявки. MGDF-1 представлен аминокислотами 22-353(фиг.11) и содержит 332 аминокислоты. MGDF-2 представляет собой отщепленный участок MGDF-1 и содержит аминокислоты 22-195, как показано на фиг.11. MGDF-2 соответственно состоит из 174 аминокислот. MGDF-3 представлен аминокислотами 22-286(фиг.12) и содержит 265 аминокислот. При описании каждого из MGDF имеется в виду, что последовательность сигнального пептида(аминокислоты 1-21 на фиг.11 и 12) также является частью заявленных в настоящем изобретении полипептидов, однако для проявления активности, определяющей рост и развитие мегакариоцитов, предпочтительно удаление сигнального пептида. В целом, данные о MGDFs можно суммировать следующим образом:

MGDF-1 аминокислоты 22-353 фиг.11

MGDF-2 аминокислоты 22-195 фиг.11

MGDF-3 аминокислоты 22-286 фиг.12

В описанных экспериментах MGDF-1 и MGDF-2 проявляют активность, в то время как MGDF-3 неактивен.

Основываясь на приведенных здесь сведениях об активности, можно предположить, что MGDF человека экспрессируется *in vivo* как практически неактивный или менее активный полипептид-предшественник, содержащий различные С-терминальные аминокислоты. При отщеплении С-терминальных аминокислот(так же как и сигнального пептида) процессированная форма(формы) полипептида приобретает активность или становится более активной. Принимая во внимание изложенное выше предположение, считается, что для проявления активности MGDF-1 необходим процессинг(например, расщепление протеазой). То обстоятельство, что MGDF-1, от которого отщеплен определенный участок(т. е. MGDF-2) является активным, подтверждает данное предположение.

Кондиционированная среда клеток 293 почки человека(Invitrogen), трансфицированных геном MGDF-1, проявляет соответствующую активность в экспериментах на клетках, описанных ниже в Примере 4. С другой стороны, в иных клеточных линиях, например, клетках 32D, активность MGDF-1 не обнаруживается. Предположительно это может объясняться способностью клеток 293 процессировать полипептид MGDF-1, возможно путем отщепления определенного участка, так что молекула, в действительности проявляющая активность, представляет собой такую процессированную форму, в то время как клетки 32D не способны к процессингу MGDF-1.

С точки зрения изложенной выше гипотезы, различные активные молекулы могут образовываться в результате отщепления определенных участков от последовательности, приведенной здесь как последовательность MGDF-1(фиг.11). К консервативным особенностям, свойственным цитокинам, таким как эритропоэтин(EPO), относятся четыре альфа-спирали и четыре цистеина. При изучении расположения молекул цистеина(эволюционно консервативных и функционально необходимых элементов) оказалось, что Cys 172 в последовательности MGDF-1 является наиболее терминальным по сравнению с молекулами цистеина в других последовательностях. Соответственно, предпочтительными вариантами MGDF-1 являются такие, которые образуются при отщеплении от MGDF-1 С-терминальных участков, начиная с аминокислоты в положении 173 и до аминокислоты в положении 353(в сочетании с отщеплением сигнального пептида). Предпочтительно, чтобы в последовательности MGDF-1 произошло отщепление в районе 50-ая - 185-ая аминокислоты, особенно предпочтительно, в районе 90-ая - 172-ая аминокислота, начиная с С-конца последовательности. Как отмечалось, длина сигнального пептида составляет 21 аминокислоту, однако, сигнальный пептид может содержать 23 аминокислоты, исходя из последовательности MGDF-1. Соответственно, полипептиды, родственные заявленному, но начинающиеся с 24-й аминокислоты см. фиг.11 или 12) тоже подлежат рассмотрению.

Ниже приведены некоторые особенно предпочтительные варианты MGDF-1, которые могут проявлять активность(т. е. способность усиливать рост мегакариоцитов и/или тромбоцитов или же ингибировать/стимулировать активность природного рецептора):

MGDF-4 аминокислоты 22-172 фиг.11

MGDF-5 аминокислоты 22-177 фиг.11

MGDF-6 аминокислоты 22-191 фиг.11

MGDF-7 аминокислоты 22-198 фиг.11

MGDF-8 аминокислоты 22-265 фиг.11

MGDF-11 аминокислоты 22-184 фиг.11

В некоторых клонах аминокислоты 133-136 в последовательности MGDF-1 отсутствовали, поэтому последовательности, соответствующие указанным выше, но в которых указанные аминокислоты утрачены(и номер С-терминальной аминокислоты уменьшен на 4), также могут проявлять активность.

В одном клоне, имеющем кодон терминации в положении 192, вместо остатка Thr в положении 191 обнаружен остаток Ala, как это отражено на Фиг.11. Таким образом, в объем изобретения включены варианты молекул MGDF, в которых вместо Thr в положении 191 находится Ala.

MGDF-3 образуется при удалении последовательности называемой здесь IVS-5(Промежуточная последовательность-5), поскольку эта последовательность сплайсируется в пределах пятого экзона. Так как 5'-конец IVS-5 входит в состав кодона, удаление этой последовательности приводит к сдвигу рамки считывания в оставшейся последовательности MGDF, который происходит в положении 160 в направлении к концу молекулы MGDF-3.

Для самого MGDF-3 не обнаружено биологической активности при трансфекции клеток 293 и тестирования соответствующей кондиционированной среды в экспериментах на клетках, как это описано в Примере 4. Очевидно, что в отличие от MGDF-1, клетки 293 не способны процессировать MGDF-3 с образованием активной формы. Тем не менее, на основании теории отщепления, описанной выше в отношении MGDF-1, отщепление С-терминальных аминокислот(например, в положении 40-102) от MGDF-3 может обеспечить его активность. Предпочтительно отщепление 50-90 аминокислот. Двумя особенно предпочтительными вариантами MGDF-2 являются следующие:

MGDF-9 22-179 фиг.12

MGDF-10 22-190 фиг.12

Во всех описанных Mpl-лигандах, включая указанные выше MGDFs, на N-терминальном участке может находиться остаток метионина, особенно в том случае, когда такие полипептиды экспрессируются в бактериальных клетках-хозяевах. Полипептиды Mpl-лиганда могут быть получены и с помощью известных методик химического синтеза. Такие методики хорошо известны специалистам в данной области исследований. Синтетические полипептиды Mpl-лиганда, имея первичную, вторичную, третичную структуру и конформационные свойства полипептидов Mpl-лиганда, полученных другими способами, могут обладать и сходными с ними биологическими свойствами. Так, они могут заменить биологически активные и иммунологически активные природные, очищенные полипептиды Mpl-лиганда при терапевтическом и иммунологическом применении.

Модификации пептидов или последовательностей ДНК, кодирующих Mpl-лиганд, могут быть получены любым специалистом в данной области исследований с помощью известных методик. Такого рода модификации последовательностей Mpl-лиганда могут включать перестановки, инсерции или делеции выборочных аминокислотных остатков в кодирующих последовательностях. Методы осуществления мутагенеза с целью получения таких перестановок, инсерции или делеций хорошо известны специалистам в данной области исследований. [См., например Патент США №4518584]. Предпочтительные пептиды могут быть получены с помощью протеолитических ферментов или путем направленного химического синтеза. Такие варианты Mpl-лиганда и полинуклеотидов включены в объем настоящего изобретения.

Специфические мутации в последовательностях полипептида Mpl-лиганда могут включать модификации в сайте гликозилирования(например, сериновом, треониновом или аспарагиновом). Отсутствие гликозилирования или только частичное гликозилирование являются результатом замены или делеции аминокислоты в аспарагин-связанном сайте гликозилирования или каком-либо другом сайте, модифицированном путем добавления О-связанного углевода. Аспарагин-связанный сайт гликозилирования содержит последовательность трипептида, которая специфически распознается соответствующим клеточным ферментом гликозилирования. Такая трипептидная последовательность может быть последовательностью Asn-Xaa-Thr или Asn-Xaa-Ser, где Xaa может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Различные замены или делеции аминокислот в одном или обоих первых или третьих положениях аминокислот в распознаваемом сайте гликозилирования(и/или аминокислотная делеция во втором положении) приводят к отсутствию гликозилирования по модифицированной трипептидной последовательности. Экспрессия таких измененных нуклеотидных последовательностей приводит к образованию продуктов, которые не гликозилированы по данному сайту.

Дополнительные аналоги/производные MGDF

Другие аналоги или производные последовательностей MGDF(Mpl-лиганды), которые могут сохранять MGDF(Mpl-лиганд)-активность(частично или полностью), могут быть получены специалистом в данной области исследований с помощью указанных здесь методов. Такие модифицированные продукты тоже включены в объем данного изобретения. Более точно, настоящее изобретение охватывает и композиции на основе химически модифицированного MGDF, а также способы приготовления и использования таких композиций. Настоящее описание показывает, что возможна модификация MGDF с усилением его активности. Один аспект изобретения заключается в получении MGDF-продукта, содержащего MGDF-белок, который связан по крайней мере с одним водорастворимым полимером. С другой стороны, изобретение относится к MGDF-продукту, при том что указанный MGDF-белок связан по крайней мере с одной молекулой полиэтиленгликоля. Кроме того, изобретение относится к MGDF-белку, связанному по крайней мере с одной молекулой полиэтиленгликоля посредством ацильной или алкильной связи.

Пэгирование MGDF может осуществляться с помощью любой реакции, известной из уровня техники. [См., например, Focus on Growth Factors 3(2): 4-10 (1992); EP 0154316; EP 0401384] и другие цитируемые здесь публикации, относящиеся к пэгированию. Предпочтительно, чтобы пэгирование осуществлялось посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реактивной молекулой

полиэтиленгликоля(или же молекулой аналогичного водорастворимого полимера). Предпочтительные варианты получения пэгированных продуктов подробно описаны ниже.

Ацилирование

Соединение с полиэтиленгликолем путем ацилирования в основном заключается в осуществлении реакции между активным эфиром полиэтиленгликоля(PEG) и MGDF-белком. Любую известную или полученную впоследствии реактивную молекулу PEG можно использовать для пэгирования MGDF. Предпочтительным активированным эфиром PEG является PEG, этерифицированный с образованием N-гидроксисукцинимидом("NHS"). Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин "ацилирование" считается включающим без ограничений следующие типы связей MGDF с водорастворимым полимером(PEG): амидную, карбаматную, уретановую и подобные им. [См. Bioconjugate Chem. 5: 133-140(1994)]. Условия реакции присоединения PEG могут быть выбраны из любых известных или открыты позднее, однако в любом случае следует избегать использования таких температур, растворителей или значений pH, которые способны инактивировать MGDF-продукты, подлежащие модификации. Условия реакции, обычно применяемые для присоединения PEG к MGDF, описаны ниже. Например, реакция с NHS-эфиром монометокси-PEG приведена на фиг.14.

Присоединение PEG путем ацилирования обычно приводит к образованию MGDF-продукта, связанного с несколькими молекулами PEG, причем аминогруппы эпсилон-лизина соединены с PEG посредством ацильной связывающей группы. Предпочтительно, чтобы соединяющая связь была амидной. Также предпочтительно, чтобы получаемый продукт, по существу, был связан только(>95%) с одной, двумя или тремя молекулами PEG. Однако, некоторые продукты с более высокой степенью пэгирования(в реакцию вступило максимальное число аминогрупп эпсилон-лизина и одна альфа-аминогруппа на аминотерминальном участке MGDF) в норме могут образоваться, причем их количество зависит от специфических условий реакции. При необходимости из реакционной смеси могут быть выделены очищенные пэгированные продукты, а также не вступившие в реакцию соединения при использовании стандартных методов очистки, в том числе диализа, высаливания, ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, гельфильтрационной хроматографии и электрофореза.

Алкилирование

Соединение с PEG путем алкилирования обычно заключается в осуществлении реакции между терминальным альдегидным производным PEG и белком, таким как MGDF, в присутствии восстанавливающего агента. Как и в случае ацилирования, подробные условия реакции алкилирования описываются ниже.

Соединение с PEG путем алкилирования также может приводить к образованию MGDF-продукта, связанного с несколькими молекулами PEG. Например, реакция алкилирования MGDF в восстанавливающих условиях, которая приводит к образованию MGDF-продукта, связанного с несколькими молекулами PEG, приведена на фиг.15. Кроме того, можно изменять условия реакции так, что присоединение PEG будет происходить только по альфа-аминогруппе N-терминального участка молекул MGDF(т. е. будут образовываться MGDF-продукты, связанные с одной молекулой PEG). Например, реакция алкилирования MGDF в восстанавливающих условиях, которая приводит к образованию MGDF-продукта, связанного с одной молекулой PEG, приведена на фиг.16. При "монопэгировании", так же как и при "полипэгировании" PEG-группы предпочтительно соединяются с белком посредством -CH₂-NH-группы. Благодаря наличию группы -CH₂-, такой тип связи называют "алкильной" связью.

Получение производных MGDF, соединенных с одной молекулой PEG, посредством восстановительного алкилирования основано на неодинаковой реактивности различных типов первичных аминогрупп(лизин в противоположность N-терминальным аминогруппам), пригодных для получения указанных производных MGDF. Реакцию проводят при таком значении pH(см. ниже), которое позволяет использовать различия pKa между остатками эпсилон-аминогрупп лизина и альфа-аминогруппами N-терминального участка белка. Благодаря такому подходу, контролируется присоединение к белку водорастворимого полимера, содержащего реакционно-способную группу, такую как альдегидная. Конъюгация с полимером происходит преимущественно на N-концевых участках белка, и значительных модификаций других реактивных групп, таких как боковые группы аминогрупп лизина, не происходит. Один важный аспект настоящего изобретения заключается в получении, по существу, гомогенного препарата конъюгированного с монополимером MGDF-белка(т. е. MGDF-белка, к которому молекула полимера прикреплена практически только в одном(>95%) определенном месте). Более точно, если используется полиэтиленгликоль, настоящее изобретение также относится к пэгированному MGDF-белку, утратившему возможные антигенные группы и содержащему молекулу полиэтиленгликоля, непосредственно связанную с MGDF-белком.

Таким образом, предпочтительный аспект изобретения заключается в получении пэгированного MGDF, причем PEG-группы(а) прикреплены(а) к молекуле белка посредством ацильной или алкильной группы. Как указано выше, такие продукты могут быть монопэгированными(например, содержащими 2-6, предпочтительно 2-5 PEG-групп). PEG-группы прикрепляются к белку в основном посредством альфа- или эпсилон-аминокислотных групп, однако не исключается возможность того, что PEG-группы могут быть присоединены к любой аминогруппе белка, которая обладает достаточной реакционной способностью, чтобы связываться с PEG в подходящих условиях проведения реакции.

Полимерные молекулы, используемые в реакциях ацилирования и алкилирования, могут быть выбраны из водорастворимых полимеров или их смесей. В случае водорастворимого полимера белок, к которому он прикреплен, не будет преципитировать в водной среде, такой как физиологическая жидкость.

Выбранный полимер следует модифицировать таким образом, чтобы он содержал одну реакционно-способную группу, такую как активный эфир в случае ацилирования или альдегид в случае алкилирования. Предпочтительно, чтобы степень полимеризации могла контролироваться, как это описано в настоящем изобретении. Предпочтительным реакционно-способным PEG-альдегидом является пропиональдегид полиэтиленгликоля, который стабилен в воде, или моно C1-C10-алкокси или арилокси его производные [см. Патент США №5,252, 714]. Полимер может быть линейным или разветвленным. При использовании для терапевтических целей конечного продукта предпочтительно, чтобы полимер был фармацевтически приемлемым. Водорастворимый полимер может быть выбран из группы, содержащей, например, полиэтиленгликоль, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этилендиоксида, полиоксиэтилированные полиолы(например, глицерин) и поливиниловый спирт. Для реакции ацилирования, полимер(ы) выбирают таким образом, чтобы он(они) имел(и) одну реакционно-способную эфирную группу. Для реакций алкилирования в восстанавливающих условиях полимер(ы) выбирают таким образом, чтобы он(они) имел(и) одну реакционно-способную альдегидную группу. В целом, водорастворимый полимер не следует выбирать из природных гликозильных остатков, поскольку эти остатки обычно более удобно присоединять к белку путем экспрессии в клетках млекопитающих. Полимер может быть любой молекулярной массы.

Особенно предпочтительно использование в качестве водорастворимого полимера полиэтиленгликоля(PEG, ПЭГ). Как отмечается в настоящем описании, для получения производных различных белков может быть использована любая форма PEG, например моно-(C1-C10)алкокси или арилокси-полиэтиленгликоль.

Как отмечалось ранее, под MGDF также понимают любую из его форм, описываемых здесь. Например, это могут быть гликозилированные или негликозилированные формы MGDF, а также белки, имеющие полную длину или же образовавшиеся в результате расщепления исходного продукта. Ниже приведены предпочтительные MGDF-белки, на основании которых могут быть получены различные производные(в каждом случае номера аминокислот соответствуют таковым на фиг.11):

MGDF-1 аминокислоты 22-353 фиг.11

MGDF-2 аминокислоты 22-195 фиг.11

MGDF-4 аминокислоты 22-172 фиг.11

MGDF-11 аминокислоты 22-184 фиг.11

MGDF-12 аминокислоты 27-353 фиг.11

MGDF-13 аминокислоты 27-195 фиг.11

MGDF-14 аминокислоты 27-172 фиг.11

MGDF-15 аминокислоты 27-184 фиг.11

Указанные MGDF-белки могут быть негликозилированы, дегликозилированы, предпочтительно, негликозилированы. Они могут быть получены в рекомбинантных бактериальных(например, E. coli) системах или в клетках млекопитающих(например, CHO).

Ниже приведены наиболее предпочтительные производные MGDF, полученные химическим путем(в каждом случае они моно или полипэгированы, т. е. например, содержат 2 - 4 молекулы PEG, присоединенные посредством ацильной или алкильной группы): пэгированный MGDF-11 пэгированный MGDF-4 пэгированный MGDF-2

В целом, получение производных MGDF химическим путем может происходить в любых подходящих условиях для вступления в реакцию биологически активного соединения с активированной молекулой полимера. Методы получения пэгированного MGDF обычно включают следующие стадии:

(а) прохождение реакции между полипептидом MGDF и полиэтиленгликолем(например, реакционно-способным эфиром или альдегидным производным PEG) в условиях, когда MGDF соединяется с одной или более PEG-группами, и

(б) выделение продукта(продуктов) реакции. В целом, оптимальные, реакционные условия для ацилирования определяются от случая к случаю на основе известных параметров и желаемого результата. Например, чем больше соотношение PEG:белок, тем больше выход(в процентах) полипэгированного продукта.

Восстановительное алкилирование для получения, по существу, гомогенного конъюгата монополимер/MGDF-белок обычно включает следующие стадии:

(а) прохождение реакции между MGDF-белком с реакционно-способным PEG в условиях восстановительного алкилирования при pH, обеспечивающим селективную модификацию альфа-аминогруппы на аминок-терминальном участке MGDF-белка; и

(б) выделение продукта(продуктов) реакции.

Для получения, по существу, гомогенного конъюгата монополимер/MGDF-белок условия реакции восстановительного алкилирования должны обеспечивать избирательное связывание водорастворимого полимера с N-терминальным участком MGDF. Такие условия обычно основаны на различиях pKa между аминогруппами лизина и альфа-аминогруппой на N-терминальном участке(pKa представляет собой значение pH, при котором 50% аминогрупп протонированы, а 50% - нет), pH также влияет на используемое соотношение полимера и белка. В целом, при более низком pH требуется избыток полимера по отношению к белку(т. е., чем меньше реакционно-способных N-терминальных альфа-аминогрупп, тем большее количество полимера нужно для достижения оптимального результата). Если значение pH более высокое, не требуется большого соотношения полимер: белок(доступно большее количество реакционно-способных групп, так что требуется меньше полимерных молекул). Для целей настоящего изобретения

значение pH обычно составляет 3 - 9, предпочтительно 3 - 6.

Другой важный аспект - это молекулярная масса полимера. В целом, чем больше мол.масса полимера, тем меньшее число его молекул способно соединиться с белком. Для оптимизации данных параметров следует учитывать степень ветвления полимера. Как правило, при большей мол.массе(большей степени ветвления) выше отношение полимер:белок. Для рассматриваемых здесь реакций соединения PEG с белком мол.масса PEG в среднем составляет около 2кД - 100кД(понятие "около" соответствует +/-1кД). Предпочтительно, чтобы средняя мол.масса PEG составляла около 5кД - 50кД, особенно предпочтительно - около 12кД - 25кД. Отношение водорастворимый полимер : MGDF-белок, в основном, составляет 1:1 - 100:1, предпочтительно(для полипэгирования) 1:1 - 20:1 и(для монопэгирования) 1:1 - 5:1.

При использовании указанных выше условий, восстановительное алкилирование будет обеспечивать избирательное присоединение полимера к любому MGDF-белку, имеющему альфа-аминогруппу на аминоконъюгированном участке, и способствовать получению, по существу, гомогенного препарата монополимера, конъюгированного с MGDF-белком. Понятие "монополимер, конъюгированный с MGDF-белком", относится к соединению, содержащему молекулы PEG-белка, связанные с одной молекулой полимера. Такой конъюгат предпочтительно будет содержать молекулу полимера, расположенную на N-терминальном участке, но не на боковых аминоконъюгированных лизина. Полученный препарат, предпочтительно, более чем на 90% состоит из монополимера, конъюгированного с MGDF-белком, и предпочтительнее - более чем на 95%, при этом остаются молекулы, не вступившие в реакцию(молекулы белка, на взаимодействие с которыми не хватило полимера). В приведенных ниже примерах показано получение препарата, по крайней мере, на 90% состоящего из конъюгата монополимера и белка и на 10% состоящего из не вступившего в реакцию белка. Такой конъюгат является биологически активным.

Для проведения восстановительного алкилирования, восстанавливающий агент должен быть стабильным в водном растворе и предпочтительно обладать способностью к восстановлению только Шиффовых оснований, образовавшихся на начальных этапах восстановительного алкилирования. Предпочтительные восстанавливающие агенты могут быть выбраны из группы, содержащей борогидрид натрия, цианоборогидрид натрия, диметиламинборан, триметиламинборан и пиридинборан. Особенно предпочтительным восстанавливающим агентом является цианоборогидрид.

Другие параметры осуществления реакции, такие как растворитель, время реакции, температура и т. д., а также степень очистки продуктов могут определяться от случая к случаю на основе опубликованной информации, касающейся получения производных белков при использовании водорастворимых полимеров(см. приведенные в настоящем описании ссылки). Более подробно указанные реакции изложены в примерах, приведенных ниже.

Для получения смеси белка, конъюгированного с полимером, может быть выбран метод ацилирования и/или алкилирования, причем преимущество описанного здесь подхода заключается в том, что можно приготовить смесь с заданным относительным содержанием монополимер/белок. Таким образом, при необходимости получают смесь различных белков, связанных с различным числом молекул полимера(ди-, три-, тетра- и т. д.), в сочетании с конъюгатом монополимер/белок, полученным при использовании изложенных здесь методов, причем указанная смесь характеризуется заданным содержанием конъюгата монополимер/белок.

В приведенных ниже примерах раскрывается способ получения химически модифицированного MGDF и MGDF, соединенного с PEG посредством ацилирования или алкилирования. Соответственно другие аспекты изобретения связаны сданными соединениями.

В целом, многие болезненные состояния могут быть скорректированы путем применения заявленных конъюгатов MGDF с полимером. Однако, такие конъюгаты могут обладать модифицированной активностью, как увеличенной, так и уменьшенной, а также другими свойствами по сравнению с неизмененными молекулами.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям на основе химически модифицированных MGDF-белков. Такие фармацевтические композиции могут содержать и какой-либо из немодифицированных MGDF-белков.

По мере проведения дополнительных исследований появится информация о подходящих дозах указанных препаратов для лечения различных заболеваний у разных больных, и средний специалист в данной области исследований, учитывая медицинские показания, возраст и общее состояние пациента, сможет подобрать соответствующую дозу. В целом, доза может составлять от 0,01мкг/кг веса тела(в расчете на массу белка, не имеющего химических модификаций) до 300мкг/кг веса тела(рассчитанную аналогичным образом). Предпочтительная доза, в целом, может составлять от 5мкг/кг веса тела до 100мкг/кг веса тела, особенно предпочтительна доза от 10мкг/кг веса тела до 75мкг/кг.

Настоящее изобретение относится также к способу получения MGDF-полипептидов(полипептидов MGDF-лиганда) или их активных фрагментов. Один из заявленных способов включает встраивание кДНК, кодирующей полипептид Mpl-лиганда, в вектор экспрессии для получения системы экспрессии Mpl-лиганда. Отобранные клетки-хозяева трансфицирует данным вектором и культивируют. Способ, заявленный в настоящем изобретении, таким образом, включает культивирование подходящих клеток или клеточной линии, трансфицированных ДНК-последовательностью, кодирующей или экспрессирующей полипептид Mpl-лиганда под контролем известных регуляторных последовательностей. К регуляторным последовательностям относятся фрагменты промотора, терминатора и другие подходящие последовательности, которые направляют/контролируют экспрессию белка в соответствующих клетках-хозяевах. Затем продукт экспрессии выделяют и очищают от культуральной среды(или от клеток в случае

внутриклеточной экспрессии) любым пригодным методом, известным специалисту в данной области исследований. Кроме того, для получения заявленных полипептидов/полинуклеотидов могут быть использованы способы, описанные в Патенте США №5272071.

Подходящие клетки или клеточные линии могут быть клетками млекопитающих, например клетками яичников китайского хомячка (CHO) или 3Т3. Методы выбора подходящих клеток-хозяев, их трансформации и культивирования, амплификации, скрининга, выделения и очистки целевого продукта известны из уровня техники. См., например, Gething and Sambrook, *Nature* 293: 620-625(1981) или Kaufman et al., *Mol.Cell.Biol.* 5(7): 1750-1759(1985) или Howley et al., Патент США 4419446. К другим подходящим клеточным линиям млекопитающих относятся линии клеток обезьяны COS-1, COS-7 и CV-1. В приведенных ниже примерах используются клетки млекопитающих, в том числе линии клеток приматов и грызунов, в частности, трансформированные клеточные линии. Могут быть использованы также нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, полученные *in vitro* при культивировании первичных тканей, а также первичные эксплантаты. Клетки могут быть генетически дефектными по селективному маркеру или содержать доминантно функционирующий селективный ген. К другим подходящим клеточным линиям млекопитающих относятся (но не ограничиваются указанными) HeLa, клетки L-929 мыши, 3Т3-линии, полученные от мышей Swiss, Balb/c или NIH, а также клетки хомячка ВНК или NaK.

Подходящими клетками-хозяевами для целей настоящего изобретения являются также бактериальные клетки. Например, специалистам в биотехнологии хорошо известны различные штаммы *E.coli* (например, HB101, DH5- α , DH10 и MC1061), которые могут использоваться в качестве клеток-хозяев. Кроме того, при осуществлении заявленного способа могут быть применены различные штаммы *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и подобные им.

Для экспрессии заявленных полипептидов в качестве клеток-хозяев можно использовать и различные штаммы дрожжей, известные специалистам в данной области исследований. При необходимости для осуществления заявленного способа в качестве клеток-хозяев возможно использование клеток насекомых. См., например Miller et al., *Genetic Engineering* 8: 277-298(1986) и приведенные в настоящем описании ссылки.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным молекулам или векторам для использования в способе экспрессии новых полипептидов Mpl-лиганда. Указанные векторы содержат ДНК-последовательности Mpl-лиганда, которые сами по себе или в сочетании с другими последовательностями кодируют полипептиды Mpl-лиганда (как с сигнальным пептидом, так и без него), заявленные в настоящем изобретении, или их активные фрагменты. Альтернативно, векторы, содержащие модифицированные последовательности, как описано выше, также включены в объем изобретения и применяются для получения полипептидов Mpl-лиганда. Вектор, используемый для осуществления способа, содержит выбранные регуляторные последовательности, функционально связанные с ДНК-кодирующими последовательностями, полученными согласно настоящему изобретению, и способен направлять экспрессию таких последовательностей в клетках-хозяевах.

Для экспрессии белков в COS-клетках особенно предпочтительным является вектор pXM [Y.C.Yang et al., 47: 3-10(1986)]. Другим вектором, удобным для экспрессии белков в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, служит вектор pEMC2B1. Описанные здесь векторы для экспрессии белков в клетках млекопитающих могут быть получены известными способами. Составляющие векторов, например, репликационные, селективные маркерные гены, энхансеры, промоторы и т. д. могут быть получены из природных источников или синтезированы с помощью известных подходов. См., например, Kaufman et al., *J.Mol.Biol.* 159: 511-521(1982); и Kaufman, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82: 689-693(1985). Альтернативно, ДНК-вектор может содержать целый геном или часть генома бычьего вируса папилломы [Lusky et al., 36: 391-401(1984)] и реплицироваться в клеточных линиях, например клетках C127 мыши, как стабильный эписомальный элемент. Перенос таких векторов в соответствующие клетки-хозяева приводит к экспрессии в этих клетках полипептидов Mpl-лиганда.

Для целей настоящего изобретения могут быть использованы и другие подходящие векторы, предназначенные для экспрессии белков в клетках млекопитающих, насекомых, дрожжей, грибов и бактерий.

Болезненные состояния, которые подлежат коррекции с помощью заявленных композиций и способов их применения, в целом, являются состояниями с недостаточностью мегакариоцитов/тромбоцитов, или же возникновение такой недостаточности ожидается в будущем (например, при планируемых хирургических операциях). Указанные состояния обычно развиваются в результате недостаточности (хронической или преходящей) активного Mpl-лиганда *in vivo*. Обычным названием недостаточности тромбоцитов является тромбоцитопения, поэтому заявленные композиции и способы их применения относятся к лечению тромбоцитопении.

Тромбоцитопения (недостаточность тромбоцитов) может быть вызвана различными причинами, в том числе, химиотерапией, лекарственной терапией, радиационной терапией, хирургическими вмешательствами, случайной кровопотерей и другими заболеваниями. Примерами болезненных состояний, при которых наблюдается тромбоцитопения и которые могут быть скорректированы в соответствии с настоящим изобретением, являются апластическая анемия, идиопатическая тромбоцитопения, метастазирующие опухоли, приводящие к тромбоцитопении, системная красная волчанка, спленомегалия, синдром Фанкони, недостаточность витамина B12, недостаточность фолиевой кислоты, аномалия Мэя-Хегглина, синдром Вискотта-Олдрича и пароксизмальная ночная гемоглобинурия. Кроме того, к тромбоцитопении приводит лечение СПИДа некоторыми препаратами (например, AZT). Определенные нарушения в заживлении ран также могут быть обусловлены увеличением числа

тромбоцитов.

При ожидаемой недостаточности тромбоцитов, например в результате будущих хирургических операций, Mpl-лиганд, заявленный в настоящем изобретении, может быть применен в течение периода времени, составляющего от нескольких дней до нескольких часов до возникновения потребности в тромбоцитах. В случае острых состояний, например, при внезапных и больших кровопотерях, Mpl-лиганд может быть введен вместе с заменяющей кровью или очищенными тромбоцитами.

Заявленные Mpl-лиганды могут быть использованы и для стимуляции определенных типов клеток, отличных от мегакариоцитов, если показано, что такие клетки экспрессируют Mpl-рецептор. Состояния, ассоциированные с клетками, экспрессирующими Mpl-рецептор, ответственный за эффект стимуляции посредством Mpl-лиганда, также рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

MGDF-молекулы, которые сами по себе не проявляют активности в описываемых здесь экспериментах, могут оказаться полезными в качестве модуляторов (например, стимуляторов или ингибиторов) Mpl-рецепторов *in vitro*.

Для лечения указанных выше заболеваний заявленные полипептиды могут быть применены самостоятельно или в сочетании с другими цитокинами, растворимым Mpl-рецептором, гематопозитическими факторами, интерлейкинами, ростовыми факторами или антителами.

В соответствии с этим, еще один аспект настоящего изобретения заключается в получении терапевтических композиций для лечения приведенных заболеваний. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество полипептида Mpl-лиганда или его активного фрагмента в комплексе с фармацевтически приемлемым носителем. Носитель может представлять собой воду для инъекций, предпочтительно дополненную другими компонентами для получения растворов, которые могут вводиться перорально. При терапевтическом использовании Mpl-лиганд может быть применен в виде композиции, содержащей очищенный белок, конъюгированный с одним или более физиологически приемлемыми носителями, растворителями или разбавителями. Нейтральный буферный раствор или раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются примерами подходящих носителей. Предпочтительно, продукт приготавливают в лиофилизированной форме при использовании соответствующих растворителей (например, сахарозы). Могут быть использованы и другие обычные носители, разбавители или растворители, например Трис-буфер (pH 8,0) и ацетатный буфер (pH 5,0), которые иногда содержат сорбитол. Заявленные композиции могут вводиться парентерально. Альтернативно, композиции могут быть применены внутривенно или подкожно. При системном применении для целей настоящего изобретения терапевтические композиции могут быть приготовлены в апиогенной форме в виде водного раствора, пригодного для парентерального введения. Способы приготовления таких фармацевтически пригодных растворов белка в соответствии с необходимым pH, изотоническими свойствами, стабильностью хорошо известны специалистам в данной области исследований.

Дозировка и режим введения препаратов при осуществлении способа лечения описанных выше заболеваний подбираются практикующим врачом с учетом различных факторов, изменяющих действие лекарств, таких как возраст, состояние больного, характер его питания, вес тела, пол, тяжесть какой-либо инфекции, время применения и другие клинические факторы. В целом, ежедневно следует применять около 0,1-1000 мкг белка Mpl-лиганда или его фрагмента на 1 кг веса тела.

Композиции и полипептиды, заявленные в настоящем изобретении, при осуществлении способов лечения могут быть использованы как сами по себе, так и в сочетании с другими цитокинами, растворимым Mpl-рецептором, гематопозитическими факторами, интерлейкинами, ростовыми факторами или антителами при корригировании заболеваний, характеризующихся симптомами, отличными от тромбоцитарной недостаточности. Ожидается, что Mpl-лиганд будет действительно полезен при лечении некоторых форм тромбоцитопении в сочетании с такими мощными стимуляторами гематопоеза, как IL-3 или GM-CSF. Кроме того, вместе с Mpl-лигандом могут быть применены и другие факторы стимуляции мегакариоцитов, например, мег-КСФ (meg-CSF), фактор стволовых клеток (SCF), лейкоингибирующий фактор (LIF), онкостатин M (OSM) или иные соединения, обладающие мегакариоцитстимулирующей активностью. Дополнительными примерами цитокинов или гематопозитических факторов для указанной сочетанной терапии служат альфа-IL-1, бета-IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, колониестимулирующий фактор-1 (CSF-1), GM-CSF, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), EPO, альфа-интерферон (альфа-ИФН, IFN), бета-ИФН или гамма-ИФН. Может оказаться целесообразным одновременное или последовательное введение совместно с указанными соединениями растворимого Mpl-рецептора млекопитающих, который, по-видимому, способствует разрушению мегакариоцитов с образованием тромбоцитов, как только мегакариоциты созреют. Таким образом, введение Mpl-лиганда (для увеличения количества зрелых мегакариоцитов) с последующим применением растворимого Mpl-рецептора (для инактивирования лиганда и разрушения зрелых мегакариоцитов с образованием тромбоцитов), по-видимому, будет действительно эффективным для стимуляции образования тромбоцитов. Дозы, указанные выше, могут быть скорректированы в зависимости от того, какие дополнительные компоненты входят в состав фармацевтической композиции. Эффективность лечения контролируют соответствующими методами. Кроме того, заявленные новые полипептиды используются для получения антител. Таким образом, в объем изобретения включены антитела, взаимодействующие с Mpl-лигандом, полученным согласно настоящему изобретению, и активные фрагменты данных антител. Антитела могут быть поликлональными, моноклональными, рекомбинантными, химерными, одноцепочечными и/или биспецифическими и т. д. Фрагментом антитела может быть любой фрагмент, взаимодействующий с Mpl-лигандом, такой как Fab, Fab' и т. д. В объем настоящего изобретения также

включены гибридомы, полученные при использовании Mpl-лиганда или его фрагмента в качестве антигена для иммунизации животных, с последующим слиянием клеток животных (например, клеток селезенки) с определенной опухолевой клеточной линией. В результате слияния, осуществляемого известными методами, получают бессмертные клеточные линии, продуцирующие антитела. Способы получения гибридом и антитела, направленные к целому полипептиду Mpl-лиганда или его отдельным участкам, также включены в объем настоящего изобретения.

Антитела могут использоваться в терапии, например для ингибирования связывания Mpl-лиганда с рецептором. Антитела, связанные с соответствующей меткой, могут найти применение и в диагностике *in vivo* и *in vitro*, для выявления Mpl-лиганда в жидкостях организма.

Приведенные ниже Примеры наиболее полно раскрывают данное изобретение. Кроме того, в них отражены предпочтительные варианты осуществления изобретения без ограничения его объема. Стандартные методики для осуществления экспериментов, описанных в приведенных ниже Примерах, а также подходящие альтернативные методики, изложены в широко известных руководствах по молекулярной биологии, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) и Ausubel et al. (Eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene associates/Wiley Interscience, New York (1990).

Пример 1. Апластическая плазма собаки

Гепаринизированную апластическую плазму собаки ("APK9") или нормальную плазму собаки ("NK9") получали как описано в приведенных ниже публикациях, с той разницей, что доза облучения реципиентов составляла 450 рад:

1. Mazur, E. and South, K. *Exp. Hematol.* 13:1164-1172 (1985).
2. Arriada, M., South, K., Cohen, J.L., and Mazur, E.M. *Blood* 69:486-492 (1987).
3. Mazur, E., Basilio, D., Newton, J.L., Cohen, J.L., Carland, C., Sohl, P.A., and Narendran, A. *Blood* 76:1771-1782 (1990).

Пример 2. Определение мегакариоцитов человека

APK9 и фракционированная APK9 были проверены на способность стимулировать развитие мегакариоцитов человека из CD34+ клеток-предшественников. CD34+ клетки получали из клеток периферической крови как описано (Hokom, M.H., Choi, E., Nichol, J.L., Hornkohla, Arakawa, T., and Hunt, P. *Molecular Biology of Haematopoiesis* 3:15-31, 1994) и инкубировали в культуральной среде следующего состава: среда Дальбекко в модификации Исков (IMDM; GIBCO, Grand Island, NY) с 1% смеси глутамин-пенициллин-стрептомицин (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 10% гепаринизированная, свободная от тромбоцитов человеческая плазма АВ. Также добавляли 2-меркаптоэтанол (10⁻⁴М), пируват (110 мг/мл), холестерин (7,8 мг/мл), аденозин, гуанин, цитидин, уридин, тимидин, 2-дезоксцитозин, 2-дезоксиденозин, 2-дезоксигуанозин (каждый по 10 мг/мл, Sigma); человеческий рекомбинантный инсулин (10 мг/мл); человеческий трансферрин (300 мг/мл), соевые липиды (1%, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); человеческий рекомбинантный основной фактор роста фибробластов (2 нг/мл, Genzyme, Cambridge, MA); человеческий рекомбинантный эпидермальный ростовой фактор (15 нг/мл), ростовой фактор, полученный из тромбоцитов (10 нг/мл, Атдеп, Inc, Thousand Oaks, CA).

CD34+ клетки засевали в концентрации 200000/мл культуральной среды, в конечном объеме 15 мкл в ячейки планшетов Теразаки (Vanguard, Inc., Neptune, NJ). Клетки инкубировали в течение 8 дней во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C, затем фиксировали прямо в планшетах 1% глутаровым альдегидом и инкубировали со смесью моноклональных антител (anti-GPIb, anti GPIIb, (Bio-design) и anti GPIb (Dako, Carpinteria, CA). Иммунную реакцию выявляли при помощи системы стрептавидин-бета-галактозидаза (HistoMark, Kirkegaard and Perry). Мегакариоциты, выявляемые в виде синих колоний, подсчитывали на инвертированном фазовом микроскопе с увеличением 1000х. Результаты представляли в виде среднего числа мегакариоцитов на лунку +/- стандартная ошибка определения (SEM). В некоторых случаях данные представляли в "мегакариотитарных единицах/мл", при этом та степень, в которой данный тестируемый образец индуцировал развитие мегакариотитарных единиц была нормализована относительно использованного в опыте положительного контроля - APK9. Одну единицу определяли как то количество материала, которое приводило к образованию такого же числа мегакариотитарных единиц, что и 1 мкл стандарта APK9. Активность приписывали Mpl-лиганду если она могла быть блокирована 5-10 мкл/мл MPL-X (растворимым Mpl-рецептором).

Показано, что APK9 содержит фактор(ы), который стимулирует развитие мегакариотитарных единиц человека в данной системе. CD34+ клетки, инкубированные с 10% NK9 в течение 8 дней показали пренебрежимо малое количество окрашенных синим мегакариотитарных единиц, тогда как те же клетки, инкубированные 8 дней с 10% APK9, дали очень большое число окрашенных мегакариотитарных единиц.

На фиг.2 видно, что возрастающие концентрации Mpl-X, добавленного к культуральной системе человеческих мегакариотитарных единиц, в возрастающей степени блокируют развитие мегакариотитарных единиц. При концентрациях Mpl-X больше 5 мкг/мл наступает полное подавление. В данном опыте CD34+ клетки стимулировали 5% APK9. Это указывает на тот факт, что активность, взаимодействующая с Mpl-X (предположительно Mpl-лиганд), необходима для развития мегакариотитарных единиц человека и в APK9 присутствует собственно Mpl-лиганд.

Были получены и другие подтверждения того, что в APK9 присутствует активность Mpl-лиганда, необходимого для развития мегакариотитарных единиц человека. APK9 (135 мл) разбавили в 6 раз средой Исков и нанесли на аффинную колонку Mpl-X. Несвязавшийся материал был собран и сконцентрирован до первоначального объема перед постановкой теста. Связавшийся материал элюировали 10 мл 1 М NaCl, 20% собранного пула подвергли диафильтрации и затем сконцентрировали в 4 раза. СВ34+ клетки,

которые инкубировали в среде без добавок АРК9, не дали начала мегакариоцитам. Клетки, инкубированные с 5% АРК9(того же образца, что наносили на колонку) дали 48 +/- 8 мегакариоцитов на ячейку. Клетки, инкубированные с несвязавшимся материалом(в концентрации 10%) не образовали мегакариоцитов. Клетки, инкубированные с 10% элюата, дали счет 120 +/- 44 мегакариоцитов на ячейку. Активность в наносимом на колонку образце и активность в элюате практически полностью подавлялись 5мкг/мл Mpl-X.

Пример 3. Трансфекция Mpl-рецептора мыши или человека в мышиную клеточную линию

А. Mpl-рецептор мыши

Полноразмерная кДНК Mpl-рецептора мыши была субклонирована в вектор экспрессии, содержащий транскрипционный промотор, полученный из LTR вируса саркомы мышей Молони. 5мкг данного конструкта и 1мкг плазмиды pWLNeo, несущей селективный маркер(Stratagene) были ко-электропорированы в клетки IL-3-зависимой мышинной линии(32D, клон 23; Greenberger et al., PNAS 80: 2931-2936(1983)). Клетки культивировали в течение пяти дней для восстановления после электропорации, затем переводили на селективную среду, содержащую 800мкг/мл Генететина(G418, Sigma) и 1нг/мл IL-3. Затем выжившие клетки разделяли на два пула по 200000 клеток в каждом и подрачивали для анализа. Шесть популяций клеток были проверены на поверхностную экспрессию Mpl-рецептора методом проточной цитофлуориметрии(FACS) с использованием поликлональной кроличьей антипептидной сыворотки. Одна из популяций была отобрана для сортировки в протоке с применением той же сыворотки. Одноклеточные клоны исходной клеточной линии были получены путем подрачивания клеток на среде с 10% АРК9 и Генететином. После селекции в присутствии АРК9 в течение 35 дней клетки поддерживали культивированием в присутствии 1нг/мл мышинного IL-3. Один из субклонов, 1А6.1, был использован для выполнения основной работы.

В. Mpl-рецептор человека

Полноразмерные последовательности Mpl-рецептора человека(Vigon.I., et al., PNAS 89: 5640 - 5644(1992)) были субклонированы в вектор экспрессии, содержащий транскрипционный промотор вируса саркомы мышей Молони(тот же вектор, что и в случае мышинного рецептора). Шесть мкг данного конструкта и 6мкг амфотропного ретровирусного упаковочного конструкта(Landau, N.R., Littman.D.R., J.Virology 66: 5110-5113(1992)) были трансфецированы в три миллиона клеток 293 с использованием набора для трансфекции клеток млекопитающих на основе CaPO_4 (Stratagene). Те же клетки были ретрансфецированы после 2 дней культивирования и еще раз ретрансфецированы спустя 4 дня. Через день после последней трансфекции клетки 293 кокультивировали с клетками IL-3-зависимой мышинной линии(32D, клон 23; Greenberger et al PNAS 80: 2831-2936(1983)). После 24 часов кокультивации клетки 32D отделяли и фракционировали в градиенте BSA(Path-o-cyte; Miles Inc.). Затем клетки подрачивали в присутствии 1нг/мл мышинного IL-3 и отбирали на способность расти в присутствии 20% АРК9. Клетки сортировали проточной цитофлуориметрией(FACS) на поверхностную экспрессию рецептора с помощью поликлональной кроличьей антипептидной сыворотки. Именно эти клетки далее использовали в опытах.

Пример 4. Определение Mpl-лиганда при помощи клеток 1А6.1

Клетки 1А6.1 отмывали от присутствующего в среде IL-3 и засевали(1000клеток/15мкл конечного объема/ячейку) в планшеты Теразаки в среде альфа-MEM(Gibco) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки(FCS), Генететином(800мкг/мл), 1% пенициллином-стрептомицином(Gibco) в 1:1 последовательных разведениях тестируемых образцов. После 48 часов культивирования микроскопически определяли количество жизнеспособных клеток на ячейку. За единицу активности принимали такую активность, которая приводила к обнаружению 200 жизнеспособных клеток на ячейку. Активность приписывалась Mpl-лиганду, если она полностью подавлялась включением в определение 5-10мкг/мл Mpl-X. Активность Mpl-лиганда в усредненных единицах АРК9 составляла 4400 +/- 539 единиц/мл апластической плазмы. Если не указано специально, единицы активности Mpl-лиганда определяли в опытах с использованием клеток 1А6.1.

Определения с клетками, трансфицированными геном Mpl-рецептора человека(Пример 3В), проводили точно также, как и с клетками 1А6.1.

Пример 5. Mpl-лиганд присутствует в апластической плазме или сыворотке мыши, собаки, свиньи и человека

Mpl-лиганд присутствует в апластической плазме или сыворотке мыши, собаки, свиньи и человека(Таблица 2). Плазму собирали у мышей BDF1 до облучения и спустя 12 дней после облучения дозой 500рад. Плазму проверяли в тесте на клетках 1А6.1, и была обнаружена активность 2000единиц/мл, которая практически полностью ингибировалась Mpl-X(10мкг/мл). Плазма облученных мышей была также положительна в тесте на мегакариоцитах человека и ее активность составляла 1833ед/мл. У собак плазму собирали до облучения и 10 дней спустя после облучения в дозе 450рад. Плазму проверяли в тесте на клетках 1А6.1 и в тесте на мегакариоцитах человека. В обоих определениях была обнаружена активность, которая полностью ингибировалась Mpl-X(10мкг/мл). У свиней плазму собирали до облучения и через 10 дней после облучения(650рад). Плазму проверяли в тесте на клетках 1А6.1 и тесте на мегакариоцитах человека. В обоих определениях обнаружена активность лиганда(подавляемая Mpl-X в концентрации 10мкг/мл), сравнимая с таковой, обнаруживаемой в апластической плазме собаки. Были также получены сыворотки от апластических пациентов. Этот материал получали от больных, перенесших трансплантацию костного мозга. Сыворотки шести пациентов были проверены в тесте на клетках 1А6.1 и обнаружена активность 903ед/мл, 88% которой было обусловлено Mpl-лигандом(подавлялась 10мкг/мл Mpl-X). Сыворотки 14 пластических пациентов были также проверены в тесте на мегакариоцитах человека. В целом, они показали существенную активность, 941ед/мл, которая полностью подавлялась 10мкг/мл

Mpl-X. Данные, полученные с применением мышиного IL-3, включены, чтобы показать специфичность теста на клетках 1А6.1. Хотя этот рекомбинантный цитокин индуцирует рост данной клеточной линии, его активность не блокируется 10мкг/мл Mpl-X.

Таблица 2

Тест на клетках 1А6. (единиц/мл)			Тест на мегакариоциты человека(Меф единиц/мл)	
Вид	Среда	+Mpl-X	Среда	+Mpl-X
Мышь, норма	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
Мышь, апласт.	2000	0	1833	нет данных
Собака, норма	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
Собака, апласт.	4400+/-539	0+/-0	792+/-128	0+/-0
Свинья, норма	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
Свинья, апласт.	3866+/-1136	0+/-0	1284+/-182	10+/-10
Человек. норма	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
Человек. апласт	903+/-64	114+/-33	941+/-178	0+/-0
ИЛ-3 мыши	6000+/-565	6000+/-565	нет данных	нет данных

Пример 6. Mpl-лиганд стимулирует рост клеток 1А6.1 и развитие мегакариоцитов человека

Mpl-лиганд(обогащенный по меньшей мере в 100000 раз после хроматографии на лектине и аффинной хроматографии; см.Пример 7) стимулирует рост клеток 1А6.1 и развитие мегакариоцитов человека из 34+ клеток периферической крови в зависимости от дозы. Активность обусловлена именно Mpl-лигандом, поскольку, как показано на фиг.2 и 3, эта активность в обоих определениях может быть полностью блокирована Mpl-X.

Заявителями было также показано, что фракционированные при помощи проточной цитофлуориметрии(FACS) 34+ клетки периферической крови при инкубировании с Mpl-лигандом(в данном случае - 100ед/мл в течение 9 дней) развиваются в фенотипически нормальные, зрелые мегакариоциты. Таким образом показано, что очищенный Mpl-лиганд оказывает тот же самый эффект на мегакариоциты, что и неочищенная АРК9. Кроме того, в данном эксперименте использовали очищенные CD34+ клетки(100% CD34+), а не обогащенные, в которых доля CD34+ клеток обычно составляет 30- 50%.

Пример 7. Очистка Mpl-лиганда собаки

I. Резюме

Были очищены белки(25кД и 31кД), которые проявляли активность, приписываемую лиганду Mpl-рецептора. Белки выделены из плазмы облученных собак по схеме, включающей аффинную хроматографию на агглютинине зародышей пшеницы(WGA), аффинную хроматографию на Mpl-рецепторе, анионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию и С4 HPLC с обращенной фазой. См. фиг.46 на котором представлена данная схема очистки.

Mpl-лиганды с молекулярной массой 25кД и 31кД были очищены по существу до гомогенности и было показано, что они состоят из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем изобретении.

II. Методы

A. Осветление плазмы

Замороженную плазму(всего около 20 литров), полученную от облученных собак(см. Пример 1), оттаивали в течение ночи при 4°C; оттаивание плазмы в больших бутылках проводили при комнатной температуре в течение нескольких часов, а затем - в холодной комнате. Нерастворимый материал удаляли центрифугированием в течение 6 часов при 11000g. Плазму разводили фосфатным буферным раствором, pH 7,3, содержащим 0,01% азида натрия(PBS/азид), и фильтровали через 1,2мкм фильтр. Процедура осветления обычно приводила к двукратному разведению исходного материала.

Б. Аффинная хроматография на агглютинине зародышей пшеницы

Все операции проводили при 4°C. Осветленную плазму(две партии) наносили на колонку с иммобилизованным агглютинином зародышей пшеницы(1 литр, 10 x 12см, EY Laboratories), уравновешенную PBS/азидом. После нанесения образца несвязавшийся материал смывали с колонки PBS/азидом и колонку промывали 0,5 М NaCl в 20мм TrisHCl, pH 8. Активность Mpl-лиганда, связавшуюся с WGA-колонкой, элюировали 0,35 М N-ацетилглюкозамином(GlcNAc), 0,5 М NaCl, 20мм Tris-HCl, pH 8. Активности Mpl-лиганда не было обнаружено в проточных или промывочных фракциях.

В. Аффинная хроматография на Mpl-X рецепторе

Использованный растворимый мышиный Mpl-рецептор(Mpl-X) соответствовал целому экстраклеточному домену Mpl-рецептора минус Trp в положении 483(CM.Vigon, et al., 8: 2607-2615(1993)). Для оптимизации связывания Mpl-лиганда с Mpl-X рецептором на аффинной колонке, элюированный с WGA-колонки материал концентрировали с использованием мембранного ультрафильтра(порог отсеивания по молекулярному весу 10000, YM-10, Amicon) и концентрацию NaCl доводили до 0,2 М последующим разведением. Концентрированный материал с WGA-колонки наносили на 20-миллилитровую колонку с m-Mpl-X(растворимый мышиный Mpl-X рецептор)/цианбромид-активированная Сефароза(2,6 x 4,2см, 1,5мг m-Mpl-X на мл смолы) при скорости потока 0,9мл/мин. Колонку промывали PBS/азидом при скорости потока 1,5мл/мин, а затем высокосолевым буфером(405мл), состоящим из 10мм Tris-HCl, 1 М NaCl, 1мм CHAPS, pH 8,0. Связавшийся Mpl-лиганд элюировали с колонки буфером следующего состава: 20мм

CAPS, 1 M NaCl, 5мм CHAPS, pH 10,5. Собирали соответствующие фракции. Для нейтрализации pH к каждой фракции добавляли Tris.

SDS-PAGE и поглощение при 280нм показали наличие в профиле элюции с аффинной колонки с Mpl-X рецептором раннего белкового пика во фракциях 1-4, при том что основная активность Mpl-лиганда элюировала после фракции 5.

Г. Моно-Q-анионообменная хроматография

Наиболее очищенные фракции с нескольких аффинных колонок с Mpl-X рецептором объединяли, концентрировали и диализовали против 20мм Tris-HCl, 5мм CHAPS, pH 8,7 до конечного объема 58,5мл. Концентрацию белка в смеси оценивали по поглощению при 280нм и она составляла 0,12мг/мл(приблизительно 7мг общего белка). Смесь наносили при скорости потока 0,5мл/мин на колонку Моно-Q HR 5/5(Pharmacia), уравновешенную 20мм Tris-HCl, 5мм CHAPS, pH 8,7. Элюцию проводили линейным градиентом до 0,36 M NaCl в том же буфере в течение 27 минут. Затем колонку в течение 6 минут промывали градиентом до 0,54 M NaCl и окончательную промывку проводили 0,9 M NaCl. Собирали фракции по 1мл.

Профиль элюции с колонки Моно-Q показал, что в проточных и промывочных фракциях не содержится Mpl-лиганда и вообще сколько-нибудь значительного количества белка. Значительная активность Mpl-лиганда элюировалась во фракциях 5-7 на начальных этапах градиента NaCl. "Плечо" активности наблюдалось во фракциях 8-10, за которыми следовал главный пик, представленный фракциями 11-15. В активных фракциях имела явная полоса 25кД(по SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях). Интенсивность полосы прямо соответствовала активности Mpl-лиганда во фракциях. Эта полоса отсутствовала во фракциях 3 и 4(нет активности). Она была выражена во фракциях 5 и 6(пик активности в тестах на клетках 1A6.1) и аналогично, интенсивно окрашиваемая полоса присутствовала во фракциях 11-14(пик активности в тестах на клетках 1A6.1). Полоса была слабой в объединенных фракциях 15 и 16, что соответствовало значительно более низкой активности фракции 16.

Д. Опыты по элюции из геля

Опыты по элюции из геля были проведены с аликвотами фракций Моно Q 5 и 6 или 13 и 14. В этих экспериментах были приготовлены смеси фракций 5 и 6(по 6мкл каждой) или 13 и 14(по 7,5мкл каждой), смешаны с буфером для нанесения образцов на SDS-PAGE и нанесены на 12% SDS-гели. По завершении электрофореза, представляющие интерес полосы(1мм) вырезали и разрезали на маленькие кусочки бритвенным лезвием. Кусочки геля переносили в 1,5мл центрифужные пробирки, содержащие 0,5мл PBS/5мм CHAPS и осторожно перемешивали при 4°C в течение ночи. На следующий день пробы центрифугировали, отбирали аликвоты, и пробы подвергали диафильтрации против среды Искова с добавлением BSA в качестве белка-носителя. Диафильтрованные пробы служили для дальнейших определений.

Результаты показывают наличие двух пиков активности Mpl-лиганда. Один пик соответствует области геля 25кД, а другой пик активности Mpl-лиганда соответствует области 31кД.

Е. Гель-Фильтрация на Superdex 200

Фракции 13-16 с анионообменной колонки Моно Q и две эквивалентные фракции второго фракционирования на Моно Q объединяли и концентрировали с применением мембранного ультрафильтра(Centricon-10, Amicon). Додецил-сульфат натрия (SDS) добавляли до конечной концентрации 0,1% и образец наносили на колонку Superdex 200 HR 10/30(Pharmacia). Колонку уравновешивали 50ммTris, 0,1% SDS, pH 7,5 при скорости потока 0,3мл/мин и комнатной температуре. Фракции собирали каждую минуту. Большая часть содержащегося в образце белка элюировала во фракциях 32-40, тогда как активность Mpl-лиганда обнаруживалась во фракциях 42-46. Анализ фракций методом SDS-PAGE показал наличие явной полосы 25кД в активных фракциях.

Ж. С4 хроматография высокого разрешения с обращенной фазой

Фракции 43-46 с колонки Superdex 200 объединяли с фракцией 42 и концентрировали с помощью мембранного ультрафильтра(Microcon, Amicon). Концентрированную смесь наносили на 1 x 100мм С4 колонку с обращенной фазой(SynChropack RP-4). Колонку уравновешивали раствором 0,04% TFA в воде(буфер А); буфер В имел следующий состав: 0,035% TFA в 80% ацетонитриле. После нанесения образца проводили линейный градиент буфера В до 45% в течение 4 минут. Затем следовал линейный градиент до 75% буфера В в течение 40 минут. Скорость потока устанавливали 75мкл/мин. Результаты очистки фракции 42 представлены на фиг.5. Явные пики активности Mpl-лиганда наблюдались во фракциях 21-23. Эти фракции анализировали электрофорезом в 14%-ном геле полиакриламида в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Фракция 21 состояла из единственной полосы 31кД; фракция 23 состояла из единственной широкой полосы 25кД; и фракция 22 содержала обе полосы - 25кД и 31кД. Других значительных полос видно не было. Примечательно, что предварительные эксперименты по элюции из геля дали основания ассоциировать активность Mpl-лиганда именно к этим двум областям молекулярного веса. Единственная высокомолекулярная минорная полоса наблюдалась во всех фракциях в невосстанавливающих гелях, но ее не удавалось обнаружить в восстанавливающих гелях.

З. Анализ N-терминальных последовательностей 25кД и 31кД Mpl-лигандов

Анализ N-терминальной последовательности был выполнен на содержащих активность фракциях С4 RP-HPLC. Установленные последовательности данных белков приведены выше. В дополнение к главной последовательности, соответствующей полосе 25кД(по меньшей мере 90% используемого образца), секвенирование обнаружило две минорные последовательности(которые были ассоциированы с минорной дополнительной полосой, описанной ранее в разделе "З". Сравнение с известными

последовательностями показало, что минорные последовательности представляют собой тяжелую цепь и каппа-цепь иммуноглобулинов собаки. При необходимости эти минорные загрязнения могут быть удалены дополнительным этапом очистки, предпочтительно, дополнительной гель-фильтрацией.

И. Сравнение активности Mpl-лиганда из очищенных фракций C4

Данные, представленные на фиг.6, показывают, что активности, присутствующие во фракциях 22 и 23 хроматографии C4 RP-HPLC, по существу эквивалентны. Фракция 22 содержит смесь полос 25кД и 31кД, а фракция 23 - только полосу 25кД. Аликвоты каждой фракции разводили 1:45000. Разведенные фракции практически в равной степени стимулировали рост клеток 1A6.1(фракция 22 - 5400 клеток на ячейку, фракция 23 - 6000 клеток на ячейку). Разведенные фракции инкубировали с возрастающими концентрациями Mpl-X. Фракции были в равной степени чувствительны к ингибированию Mpl-X, активность обеих фракций полностью блокировалась Mpl-X в концентрации 7-1,4мкг/мл. Это служит указанием на то, что активный белок(белки) каждой фракции - это разновидности Mpl-лиганда с одинаковой биологической активностью.

Пример 8. Сравнение действия Mpl-лиганда на развитие мегакариоцитов с действием других факторов

Показано, что ряд рекомбинантных факторов и органических соединений, таких как форбол-миристил-ацетат(PMA), оказывают влияние на рост и развитие мегакариоцитов. Изучали воздействие этих факторов на CD34-положительные клетки периферической крови. Рекомбинантный интерлейкин 3 человека(IL-3, 1нг/мл), фактор роста стволовых клеток(SCF, 50нг/мл), Интерлейкин 6(IL-6, 25нг/мл), эритропоэтин(EPO, 1ед/мл), фактор ингибирования лейкоза(LIF, 10нг/мл) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор(GM-CSF, 25нг/мл, Amgenjnc.); интерлейкин 11(IL-11, 25нг/мл, R+D Systems, minneapolis, MN); форбол-миристил-ацетат(PMA, 10^{-10} M, Sigma) добавляли к культурам как указано. Mpl-лиганд использовали в концентрации 275 единиц на мл, APK9 использовали в концентрации 5%(эквивалент 220единиц/мл). При использовании факторов в комбинации их концентрация была равна таковой при индивидуальном использовании. После 8 дней культивирования клетки фиксировали в ячейках и окрашивали на мегакариоциты($n=6$ ячеек на каждый вариант) или подсчитывали общее число клеток($n=3$ ячеек на каждый вариант). Данные представлены средним числом $\pm$ стандартная ошибка.

На фиг.7 показано, что APK9 и Mpl-лиганд приводили к образованию наибольшего числа мегакариоцитов на ячейку. IL-3 также приводил к развитию мегакариоцитов, особенно в сочетании с SCF IL-6, IL-11 или EPO оказывали незначительный эффект на количество образовавшихся мегакариоцитов при индивидуальном воздействии или в сочетании с IL-3. PMA, LIF и GM-CSF имели слабое воздействие. На фиг.8 приведены данные того же эксперимента, показывающие общее число клеток в ячейках("клеточность"). APK9 и Mpl-лиганд слабо изменяли этот показатель, а IL-3 и SCF проявляли умеренное воздействие. Сочетание SCF и IL-3 оказывало самый сильный эффект. Данные, приведенные на фиг.7 и фиг.8, были использованы для вычисления процента мегакариоцитов на ячейку, как показано на фиг.9. Очевидно, что фактором, приводящим к образованию самого высокого процента мегакариоцитов на ячейку, является Mpl-лиганд, активный компонент APK9. Это указывает на специфичность Mpl-лиганда по отношению к мегакариоцитам.

Пример 9. Мегакариокит-стимулирующая активность Mpl-лиганда не зависит от IL-3 человека

Mpl-лиганд стимулирует развитие мегакариоцитов человека при его добавлении в культуральную среду, как это описано в Примере 2. Хотя IL-3 не является компонентом культуральной среды, он может присутствовать в необнаружимо малых количествах в нормальной человеческой плазме, входящей в состав среды. Однако, если IL-3 и присутствует, он не участвует в мегакариопозе, обусловленном Mpl-лигандом. Это видно из фиг.10. IL-3 в концентрации 2нг/мл имеет активность в тесте на мегакариоциты человека, равную 14900 мегакариокитарных единиц/мл. Эта активность на 97% подавляется anti-IL-3(3,3мкг/мл; Genzyme, Cambridge, MA). Mpl-лиганд в концентрации 8203 мегакариокитарных единиц/мл не подавлялся anti-IL-3.

Пример 10. Анализ Mpl-лиганда свиньи

I.Резюме

Белки из плазмы облученной свиньи с активностью Mpl-лиганда были охарактеризованы с помощью WGA-аффинной хроматографии, аффинной хроматографии на Mpl-рецепторе, ионообменной хроматографии и C4 хроматографии высокого давления с обращенной фазой(HPLC). Активность также характеризовали путем элюции из срезов SDS-полиакриламидного геля.

Хроматография	Комментарии
WGA-аффинная колонка	нанесено 4.4 миллиона единиц снято 3.4 миллиона единиц
Колонка с M PL-рецептором	нанесено 2.7 миллиона единиц снято 2.4 миллиона единиц
Моно S ионообменник, pH 6.0	нанесено 2.4 миллиона единиц снято 4.4 миллиона единиц
C4 HPLC с обращенной фазой	активность обнаружена во фракциях 23-25

Опыты по элюции из геля

Две явно различимые активности, одна - приблизительно 18кД, другая - приблизительно 28кД

Пример 11. Клонирование Mpl-лиганда человека(MGDF человека)

Ниже приведены два использованных подхода:

I. Первый пример клонирования А. Получение пробы MGDF человека

Ряд дегенеративных ПЦР-праймеров был сконструирован на основе последовательности amino-конца белка собаки. Для амплификации гена MGDF из геномной ДНК человека использовали различные пары праймеров. После 40 циклов амплификации с использованием смысловых праймеров 5' GCN CCN CCN HCN TGY GA 3'(SEQ ID NO:4), кодирующих пять первых аминокислот белка собаки(SEQ ID NO:1) и антисмыслового праймера: 5' GCA RTG YAA CAC RTG NGA RTC 3'(SEQ ID NO:5), кодирующего аминокислоты с 16 по 21 последовательности SEQ ID NO:1, продукт ПЦР был разогнан в геле 2,0%-ной агарозы в буфере TBE. Полоса, соответствующая фрагменту 63 пары оснований, была вырезана из геля и реамплифицирована с тем же самым набором праймеров. Продукт ПЦР клонировали в векторе PCR II(Invitrogen, San Diego). Ряд колоний был проскринирован при помощи секвенирования ДНК. Плазмидную ДНК, кодирующую пептид, сходный с белком MGDF собаки, использовали для получения радиоактивной пробы в последующем скрининге кДНК-библиотек. Аминокислотная последовательность, кодируемая фрагментом гена, была следующей:

Ala-Pro-Pro-Ala-Cys-Asp-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His(SEQ ID NO:6)

Фрагмент агарозного геля, содержащий MGDF человека, использовали для получения пробы посредством "горячей" ПЦР. Типичная реакционная смесь ПЦР объемом 100мкл содержала следующие компоненты:

матричная ДНК	2-3мкл
5'праймер(SEQ ID NO:4)	1мкл, 20пМ
3'праймер(SEQ ID NO:5)	1мкл, 20пМ
10 x буфер	10мкл
dATP(0,1мМ)	2мкл
dTTP(10мМ)	2мкл
dGTP(10мМ)	2мкл
dCTP(0,1мМ)	2мкл
dCTP, P32(10 мКи/мкл)	5мкл
dATP, P32(10 мКи/мкл)	5мкл
Taq ДНК-полимераза	0,5мкл, 2,5единиц
вода	77мкл
общий объем	100мкл

Условия амплификации были следующими: начальный нагрев 94°C, 2 мин

отжиг 53°C, 30сек

наращивание 72°C, 30сек

денатурация 94°C, 30сек

Было выполнено 40 циклов амплификации на приборе Perkin Elmer GeneAmp System 9600.

Продукт очищали на колонке(push column)(Stratagene, San Diego). В сцинтилляционном счетчике просчитывали 1мкл пробы. Те пробы, которые содержали 1-3 миллиона импульсов на мл, добавляли к гибридизационной смеси.

Б. Конструирование библиотеки эмбриональной печени

У фирмы Clontech laboratories была куплена полиА+ РНК эмбриональной печени человека. Около 4мкг РНК использовали для синтеза кДНК, в котором для праймирования служил случайный гексамер, 5' GTA CGC GTT CTA GAN NNN NNT 3',(SEQ ID NO:7), соединенный с олигонуклеотидом, содержащим сайт рестрикции Xba I.

Для получения двунитчатой кДНК применяли протокол Gibco-BRL. Адаптор Eco RI-BstXI(Invitrogen, San Diego) лигировали с двунитчатой кДНК и затем рестрицировали ферментом Xba I.

Отбор кДНК по размеру осуществляли на колонке S500 Sephacryl(Life Technologies, Inc.). Молекулы кДНК, имеющие размер более 400 пар оснований, лигировали с вектором для экспрессии в клетках млекопитающих v19.8 [Martin, F., Cell 63: 203 - 211(1990)], предварительно рестрицированным ферментами Eco RI и Xba I. Трансформировали компетентные клетки 1E. coli 0DH10 и полученную библиотеку делили на 7 пулов по 100000 клонов кДНК в каждом.

В. Скрининг библиотеки в фазе лямбда

Библиотека эмбриональной печени человека в фазе лямбда gt11 с титром 650 миллионов бляшкообразующих единиц/мл была куплена у фирмы Clontech. Около 2-х миллионов бляшек было проскринировано с пробой, полученной ПЦР(см. выше). Гибридизацию проводили в течение 15 часов при 56°C в 6хSSC, 5х растворе Денхардта, 0,1% SDS, 100мкг/мл однострочной ДНК спермы лосося.

Проводили многочисленные раунды скрининга. ДНК из единичных бляшек амплифицировали и для идентификации истинно положительных бляшек данную ДНК гибридизовали с внутренним праймером 5' AGT TTA CTG AGG ACT CGG AGG 3'(SEQ ID NO : 8), кодирующим аминокислоты с 7-й по 13-ю последовательности SEQ ID NO : 6.

Г. 3'-праймированная быстрая амплификация концов кДНК(RACE)

Полиаденилированная РНК из человеческой эмбриональной почки и человеческой эмбриональной печени была куплена у Clontech. Один микрограмм РНК подвергали обратной транскрипции с использованием в качестве праймера олигонуклеотида 5' TTC GGC CGG ATA GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'(SEQ ID NO : 9).

Набор для синтеза кДНК Gibco-BRL [Life Technologies, Inc. Cat. # 18267-013] использовали для получения первой нити кДНК. Общий объем составлял 30мкл.

Реакцию останавливали добавлением 500мМ EDTA до конечной концентрации 10мМ и смесь замораживали при -20°C.

Для начала ПЦР использовали в качестве матрицы 0,5мкл кДНК. Праймер SEQ ID NO : 9 и конкурентный олигонуклеотид 5' TTC GGC CGG ATA GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'(SEQ ID NO : 10) использовали как антисмысловые праймеры, тогда как олигонуклеотид 5' TGC GAC CTC CGA GTC CTC AD 3'(SEQ ID NO : 11), кодирующий аминокислоты с 5-й по 11-ю последовательности SEQ ID NO : 6, использовали в качестве смыслового праймера. Сорок циклов амплификации было проведено по следующему протоколу: 94°C, 30сек; 65°C, 30сек; 72°C, 30сек; после начальной 2-х минутной инкубации при 94°C. Для амплификации использовали прибор Perkin Elmer GeneAmp System 9600.

Закрепление("nesting") проводили с применением смыслового праймера 5' GAG TCC TCA GTA AAC TGC TTC GT 3'(SEQ ID NO : 12), кодирующего аминокислоты с 8-й по 14-ю последовательности SEQ ID NO : 6, при том, что последовательности SEQ ID NO : 9 и SEQ ID NO : 10 служили антисмысловыми праймерами. Было проведено сорок циклов амплификации с отжигом при 65°C. Продукты ПЦР фракционировали электрофорезом в 0,8% геле агарозы и фотографировали в ультрафиолете. Были видны полосы в районе 0,8 - 1,2 килобаз.

Затем продукты ПЦР клонировали в вектор PCR II(Invitrogen).Отбирали индивидуальные колонии и выделяли плазмиды с помощью наборов Qiagen(Cat. # 12143 и 12145). Двунитчатое секвенирование было проведено с использованием векторных праймеров. Последовательности анализировали с помощью различных типов программного обеспечения GCG.

Д. Нарастивание цепи ДНК с помощью 3' и 5' праймеров

Для получения последовательности полноразмерного гена MGDF было проведено нарастивание цепи ДНК с помощью 3' и 5'-праймеров с использованием в качестве матриц различных рулов библиотеки эмбриональной печени. Для амплификации 5'-праймера кДНК использовали в качестве матрицы около 20нг кДНК из каждого пула. Использовали MGDF-специфический антисмысловый праймер 5' GGA GTC ACG AAG CAG TT AC 3'(SEQ ID NO : 13), кодирующий аминокислоты с 12-й по 17-ю последовательности SEQ ID NO : 6, и 5' векторный V19.8 смысловый праймер 5' CCT TTA CTT CTA GGC CTG 3'(SEQ ID NO : 14). Амплификацию проводили в течение 30 циклов с отжигом при 53°C, Закрепление проводили в течение 30 циклов с антисмысловым праймером 5' GAG GTC ACA AGC AGG AGG A 3'(SEQ ID NO : 15) (кодирует аминокислоты с 1-й по 6-ю последовательности SEQ ID NO : 6) и векторным праймером SEQ ID NO : 14.

Для нарастивания цепи с 3' концов кДНК MGDF использовали антисмысловый векторный праймер 5' GGC ATA GTC CGG GAC GTC G 3'(SEQ ID NO : 16) и MGDF-специфический праймер 5' TCC TCC TGC TTG TGA CCT C 3'(SEQ ID NO : 17), кодирующий аминокислоты с 1-й по 6-ю последовательности SEQ ID NO : 6. Амплификацию проводили в течение 30 циклов с отжигом при 58°C.

Амплификацию закрепления("nesting amplification") проводили в течение 30 циклов с использованием MGDF-праймера SEQ ID NO : 12 и векторного праймера SEQ ID NO : 16. Специфические полосы были обнаружены в пулах 1,7 и 8, которые затем клонировали в вектор PCR II. Плазмидную ДНК из отдельных колоний очищали и секвенировали.

Е. Выделение полноразмерных клонов MGDF человека

Многие из исходных клонов утрачивали часть amino-конца MGDF, поскольку часть последовательности MGDF использовалась для праймирования и закрепления. Праймер 5' CCA GGA AGG ATT CAG GGG A 3'(SEQ ID NO : 18), последовательность которого была получена в опытах по нарастиванию 5'-праймера как описано выше, использовали как смысловый праймер. Векторный праймер SEQ ID NO: 16 служил антисмысловым праймером. Проводили 35 циклов амплификации с отжигом при 58°C. MGDF-специфический праймер 5' CAA CAA TGC GAC CGC CAG CCA GAC ACC CCG 3'(SEQ ID NO: 19), содержащий сайт рестрикции Sal I, и векторный праймер(SEQ ID NO: 15) использовали для закрепления("nesting") в течение 35 циклов. Продукт ПЦР клонировали в векторе PCR II и секвенировали.

II. Второй пример клонирования

А. Клонирование N-концевой кДНК MGDF собаки

Дегенерированные олигонуклеотидные праймеры были сконструированы на основе N-терминальной последовательности аминокислот MGDF собаки, описанной в предыдущих разделах. Данные праймеры использовали в полимеразной цепной реакции(ПЦР) для амплификации последовательностей кДНК, кодирующих MGDF.

Тотальную РНК выделяли из образцов почек собаки гуанидин-изотиоцианатным методом по Chomczynski and Sacchi [Biochem. 162: 156-159(1987)]. Первую нить кДНК получали со случайным праймер-адаптором 5' GGC CGG ATA GGC CAC TCN NNN NNT 3'(SEQ ID NO: 20) с использованием обратной транскриптазы Mo-MuLV и использовали в качестве матрицы в последующих полимеразных цепных реакциях. ПЦР проводили в объеме 0,5мкл с ~ 50нг кДНК, с использованием праймера А 5' GCN CCN CCN GCN TGY GA 3'(SEQ ID NO: 4), праймера смысловой цепи, кодирующего аминокислоты 1 - 6 последовательности SEQ ID NO: 1, а также праймера В 5' GCA RTG NAG NAC RTG NGA RTC 3'(SEQ ID

NO: 5) или же праймера С 5' GCA RTG YAA NAC RTG NGA RTC 3'(SEQ ID NO: 21), которые являются праймерами антисмысловой цепи, кодирующими аминокислоты 16 - 21 последовательности SEQ ID NO: 1, с тремя дополнительными нуклеотидами на 5'-конце для повышения стабильности при гибридизации. ПЦР с Taq полимеразой проводили в течение 35 - 45 циклов до тех пор, пока полосы продукта не становились четко различимы при электрофорезе в гелях агарозы. Для первых двух циклов ПЦР отжиг проводили при 37°C в течение двух минут, для последующих циклов ПЦР отжиг проводили при 50°C в течение одной минуты. В каждой реакции наблюдали множественные полосы продукта. Фрагменты геля, содержащие полосы ожидаемого размера (66 пар оснований), извлекали с помощью пастеровской пипетки и проводили реамплификацию с той же самой парой праймеров. ДНК-продукты клонировали в вектор PCR II (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя. Три клона были секвенированы и показано, что они кодируют в одной рамке считывания ожидаемые последовательности MGDF собаки, остатки 1 - 21. Таким образом, была получена уникальная кДНК MGDF собаки, представляющая область от третьего нуклеотида кодона 6 до третьего нуклеотида кодона 15. Один из указанных клонов служил матрицей для получения меченой кДНК-пробы MGDF собаки.

Б. Конструирование кДНК-овой библиотеки из эмбриональной печени человека

РНК выделяли из человеческой эмбриональной печени (International Institute for the Advancement of Medicine, Exton, PA) путем лизиса ткани в 5,5М гуанидинизотиоцианате и очистки центрифугированием в CsTFA (Pharmacia). Полиаденилированную РНК получали с использованием олиго(dT)25 дайнабидс (DynaI, согласно указаниям производителя). Двунитчатую кДНК получали из указанной РНК с использованием плазмидной системы Superscript для синтеза кДНК (Life Technologies, Inc.) с единственным исключением, состоявшим в использовании отличного адаптера: 5' TTG GTG TGC ACT TGT G 3' (SEQ ID NO: 22) и 5' CAC AAG TGC ACA ACC CC 3' (SEQ ID NO: 23). После отбора по размеру данная кДНК была направленно встроена по сайтам Bst XI NotI в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих pBCB (pBCB получена на основе плазмиды Rc/CMV, Invitrogen, состоящей из скелета pUC19, промотора CMV и сайта полиаденилирования BGH). Лигированную ДНК вводили электропорацией в клетки электрокомпетентного бактериального штамма 10B (Life Technologies, Inc.).

В. Скрининг на MGDF кДНК-овой библиотеки эмбриональной печени человека

Библиотеку человеческой эмбриональной печени, фиксированную в виде реплик на фильтрах, гибридизовали с радиоактивным ПЦР-продуктом кДНК N-конца MGDF (5x SSPE, 2x раствор Денхардта, 0,05% пиррофосфат натрия, 0,5% SDS, 100мкг/мл лизат дрожжевой тРНК и 100мкг/мл денатурированная ДНК спермы лосося) при 64°C в течение 18 часов. Фильтры отмывали при 64°C в 5x SSPE, 0,5% SDS и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение ночи. Были выделены и проанализированы два различных клона, гибридизовавшихся с указанной пробой.

Г. Экспрессия кДНК-овых клонов MGDF человека

Очищенной ДНК кДНК-овых клонов MGDF трансфицировали клетки линии 293 EBNA (Invitrogen). 1,5мкг ДНК смешивали с 7,5мкл Липофектамина (Life Technologies, Inc.) в 100мкл среды DMEM без сыворотки. После 20 минут инкубации при комнатной температуре смесь ДНК-липофектамин добавляли к 5 x 10⁵ клеток/лунку (24-луночные планшеты Greiner) в 400мкл DMEM, 1% сыворотки (Fetal Clone II) и инкубировали при 37°C 6 часов. Затем к клеткам добавляли по 500мкл DMEM с 20% сыворотки (Fetal Clone II). Через 72 часа собирали кондиционированную среду и центрифугировали через 0,22-микронный центрифужный фильтр. Кондиционированную среду проверяли на биологическую активность MGDF.

III. Описание и активность клонов MGDF человека

С применением описанной выше стратегии клонирования были получены клоны кДНК человека, представленные на фиг.11 (MGDF-1 и MGDF-2; SEQ ID NOS: 24, 25 и 26, 27) и фиг.12 (MGDF-3; SEQ ID NOS: 28, 29). Каждая из представленных на чертежах последовательностей содержит сигнальную последовательность аминокислот 1 - 21, так что в каждом случае зрелый белок начинается с аминокислоты 22.

Результаты определения активности с использованием описанных в Примере 4А клеточных тестов, представлены ниже в Таблицах 3 и 4. В Таблице 3 кондиционированную среду клеток 293, трансфицированных каждым из конструкторов, собирали после двух дней культивирования и проверяли в тесте на клетках 1A 6.1 (32D/mur-MPL+) +/- 10мкг/мл mur-MPL-X. В Таблице 4 кондиционированную среду клеток 293, трансфицированных каждым из конструкторов, собирали после четырех дней культивирования и проверяли в тесте на клетках 32D/mur-MPL+ (Пример 3А) и клетках 32D/hu-MPL+ (Пример 3В). Как можно видеть из этих данных, MGDF-1 и MGDF-2 человека, но не MGDF-3, активны в отношении клеточных линий, экспрессирующих Mpl человека и мыши. Клеточная линия, экспрессирующая рецептор Mpl человека более чувствительна к MGDF-1 и MGDF-2 человека, чем клеточная линия, экспрессирующая Mpl-рецептор мыши.

Таблица 3

Клон	Ед/мл (-mur-MPL-X)	Ед/мл (+mur-MPL-X)
Среда	0	0
PBCO (контроль плазмиды)	0	0
MGDF-1	12800	800
MGDF-1 (повтор)	12800	566
MGDF-2	4525	400

MGDF-2(повтор)	12800	1131
MGDF-3	0	0
MGDF-3(повтор)	0	0
APK9 контроль	4400 +/-400	0

Таблица 4

Клон	Ед/мл 32D/mur-MPL+	Ед/мл 32D/hu-MPL+
MGDF-1	1600	25600
MGDF-2	6400	50000
MGDF-2(повтор)	6400	50000 - 100000

Из представленных в Таблице 5 результатов видно, что активность человеческого MGDF-1 и MGDF-2 по отношению к клеткам 32D/hu-MPL+(Пример 3В) почти полностью подавляется растворимым человеческим mpl-рецептором(hu-MPL-X). Hu-MPL-X присутствует в кондиционированной среде клеток CHO, продуцирующих этот белок. Эта кондиционированная среда была сконцентрирована в 120 раз и затем добавлена к культурам до концентрации 6,6%. Кондиционированная среда контрольных клеток CHO в данном определении не проявляла никакого эффекта. Определение проводили как описано в Примере 4В с тем исключением, что жизнеспособные клетки определяли после трех дней культивирования.

Таблица 5

Клон	Ед/мл(-Hu-MPL-X)	Ед/мл(+HU-MPL-X)
MGDF-1	530	0
MGDF-2	270	0

Определение мегакариоцитов человека

MGDF-1 и MGDF-2, но не MGDF-3 индуцировали образование мегакариоцитов из CD34-положительных клеток периферической крови. Эксперимент, представленный в Таблице 6, проводили как описано в Примере 2 с тем исключением, что CD34-положительные клетки периферической крови отбирали без элютиации и культуру использовали после семи дней роста. Кондиционированную среду от каждого 293 EBNA MGDF конструктора использовали в конечной концентрации 20% +/-30мкг/мл mur-MPL-X. Контрольную плазму APK9 использовали в конечной концентрации 6%.

Таблица 6

Клон	Количество мегакариоцитов на ячейку(-mur-MPL-X)	Количество мегакариоцитов на ячейку(+mur-MPL-X)
контрольный вектор	0	0
контроль APK9	100 +/-3	0
MGDF-1	142 +/-48	17 +/-2
MGDF-2	100 +/-3	6 +/-2
MGDF-2 повтор	86 +/-10	0
MGDF-3	2 +/-2	0

Пример 12.

В данном примере описывается синтез 12 различных пэгированных молекул MGDF, а именно - ПЭГ9 - ПЭГ12 и ПЭГ14 - ПЭГ21. В каждом случае молекула MGDF, которую соединяли с ПЭГом, представляла собой MGDF-11, полученную с помощью E.coli(аминокислоты 22-184, пронумерованные от начала сигнального пептида, или же аминокислоты 1-63, пронумерованные от начала зрелого пептида). Подробные сведения обо всех пэгированных соединениях приведены ниже в таблицах 7 - 10.

12.1. Получение поли-МеPEG-MGDF путем ацилирования MGDF с активированными МеPEG-производными

Получение поли-МеPEG(20кД) - MGDF-конъюгата(ПЭГ11)

Охлажденный(4°C) раствор MGDF(2,5мг/мл) в 0,1М BICINE-буфере, pH 8, добавляют к 10-кратному молярному избытку твердого сукцинимидилпропионата МеPEG(мол.масса 20кД) (Shearwater Polymers, Inc.). Полимер растворяют при осторожном перемешивании, и далее реакцию проводят при комнатной температуре.

Степень модификации белка в процессе реакции контролируют с помощью HPLC, учитывая размер молекул(size exclusion SEC), при использовании колонки Superdex 200 HR 10/30(Pharmacia Biotech). Элюцию проводят 0,1М натрий-фосфатным буфером при pH 6,9 и скорости потока 0,7мл/мин.

Исследование реакционной смеси путем SEC HPLC через 30 минут показывает, что в ней не остается свободного белка. В этой временной точке концентрацию белка в реакционной смеси уменьшают до 1мг/мл добавлением стерильной воды, а pH смеси доводят до 4 с помощью нескольких капель 0,5М уксусной кислоты.

MePEG-MGDF-конъюгат отделяют от избытка MGDF и других побочных продуктов реакции путем ионообменной хроматографии при использовании SP Sepharose HP(Pharmacia Biotech) в качестве ионообменной смолы.

Реакционную смесь наносят на колонку(2,5мг/мл ионообменной смолы) и не вступивший в реакцию MePEG элюируют стартовым буфером А(3 объема колонки, 20мм фосфата натрия, pH 7,2, 15% глицерина). Затем элюируют MePEG-MGDF-конъюгат с помощью линейного градиента(от 0% до 30%) конечного буфера В(10 объемов колонки) (1М NaCl в буфере А). Элюат исследуют при 280нм. Фракции, содержащие полиMePEG-MGDF-конъюгат, объединяют, концентрируют и стерилизуют фильтрованием.

Очищенный поли-MePEG-MGDF-конъюгат анализируют с помощью SEC HPLC при использовании гель-фильтрационных колонок TSK-GEL 64000SWXL и 62000SWXL, объединенных в серии. Белки выявляют по поглощению в ультрафиолете при 280нм. В качестве маркеров молекулярной массы глобулярных белков используют гель-фильтрационные стандарты BIO-RAD.

Как можно видеть на фиг.17А, с помощью SEC HPLC в препарате выявляются два основных компонента(в примерном соотношении 2 к 1), причем их точки элюции соотносятся с глобулярными белками мол.массы 370.9кД и 155.0кД соответственно(см.также приведенную ниже Табл.8).

Конъюгаты PEG9, PEG10 и PEG12, полученные путем ацилирования MGDF с сукцинимидированными эфирами MePEGs мол.массы 6 - 50кД, исследуют аналогичным образом. Основные параметры реакций, используемых для получения соответствующих препаратов, приведены в Таблице 7.

Результаты исследований полученных конъюгатов с помощью SEC HPLC приведены в Таблице 8.

12.2 Получение поли-MePEG-MGDF-конъюгатов путем алкилирования MGDF с альдегидами MePEG в восстановительных условиях

Получение поли-MePEG(20Kfl)-MGDF-конъюгата(PEG20)

К охлажденному(4°C), перемешанному раствору MGDF(2мл, 2,5мг/мл) в 100мм фосфате натрия, pH 5, содержащему 20мм NaCNBH₃, добавляют 10-кратный молярный избыток монометокси-полиэтиленгликолевого альдегида(MePEG)(средняя мол.масса 20кД) и перемешивание реакционной смеси продолжают при той же температуре.

Степень модификации белка в процессе реакции контролируют с помощью SEC HPLC при использовании колонки Superdex HR 10/30(Pharmacia Biotech). Элюцию проводят 0,1М натрий-фосфатным буфером при pH 6,9 и скорости потока 0,7мл/ мин.

Через 16 часов исследование реакционной смеси методом SEC HPLC показывает, что более, чем 90% первоначального количества белка модифицировано. В это время концентрация белка в реакционной смеси устанавливают на 1мг/мл, разбавляя ее стерильной водой, а pH доводят до 4 добавлением 0,5М уксусной кислоты.

MePEG-MGDF-конъюгат отделяют от избытка MePEG и других побочных продуктов реакции путем ионообменной хроматографии при использовании SP Sepharose HP(Pharmacia Biotech) в качестве ионообменной смолы.

Реакционную смесь наносят на колонку(2,5мг/мл смолы), и не вступивший в реакцию MePEG элюируют стартовым буфером А(3 объема колонки, 20мм фосфата натрия, pH 7,2, 15% глицерина). Затем MePEG-MGDF-конъюгат элюируют с помощью линейного градиента(от 0% до 30%) конечного буфера В(10 объемов колонки) (1М NaCl в буфере А). Элюат исследуют при 280нм. Фракции, содержащие поли-MePEG-MGDF-конъюгат, объединяют, концентрируют и стерилизуют фильтрованием.

Очищенный поли-MePEG-MGDF-конъюгат анализируют с помощью SEC HPLC при использовании гель-фильтрационных колонок TSK-GEL 64000SWXL и 62000 SWXL, объединенных в серии. Белки выявляют по поглощению в ультрафиолете при 280нм. В качестве маркеров молекулярной массы глобулярных белков используют гель-фильтрационные стандарты BIO-RAD.

Как можно видеть на фиг.17В, с помощью SEC HPLC в препарате выявляется два основных компонента(52% и 47% от общего количества белка), причем их точки элюции соотносятся с глобулярными белками мол.массы 359.4кД и 159.3кД соответственно(см. также приведенную ниже Табл.8).

Конъюгаты PEG 18, PEG 19 и PEG 21, полученные путем восстановительного алкилирования MGDF с альдегидами MePEG мол.массы 6 - 25кД, исследуют аналогичным образом. Основные параметры реакций, используемых для получения соответствующих препаратов, приведены в Таблице 7.

Результаты исследований полученных конъюгатов с помощью SEC HPLC приведены в Таблице 8.

12.3. Получение конъюгатов MGDF с монометоксиполиэтиленгликолем путем его соединения с альфа-аминоостатком на N-терминальном участке MGDF

Получение mono-PEG(20кД)-MGDF-конъюгата(PEG16)

К охлажденному(4°C), перемешанному раствору MGDF(2мл, 2,5мг/мл) в 100мм фосфате натрия, pH 5, содержащему 20мм NaCNBH₃, добавляют 5-кратный молярный избыток монометокси-полиэтиленгликолевого альдегида(MePEG) (средняя мол.масса 20кД) и перемешивание реакционной смеси продолжают при той же температуре.

Степень модификации белка в процессе реакции контролируют с помощью SEC HPLC при использовании колонки Superdex 200 HR 10/30(Pharmacia Biotech). Элюцию проводят 0,1М натрий-фосфатным буфером при pH 6,9 и скорости потока 0,7мл/мин.

Через 16 часов исследование реакционной смеси методом SEC HPLC показывает, что более, чем 90% первоначального количества белка модифицировано. В это время концентрацию белка в реакционной смеси уменьшают на 1мг/мл, разбавляя ее стерильной водой, а pH доводят до 4 добавлением 0,5М уксусной кислоты.

Моно-МеPEG(20кД)-MGDF-конъюгат отделяют от избытка МеPEG и других побочных продуктов реакции путем ионообменной хроматографии при использовании SP Sepharose HP(Pharmacia Biotech) в качестве ионообменной смолы.

Реакционную смесь наносят на колонку(2,5мг/мл смолы) и не вступивший в реакцию МеPEG элюируют стартовым буфером А(3 объема колонки, 20мм фосфата натрия, рН 7,2, 15% глицерина).

Затем МеPEG-MGDF-конъюгат элюируют с помощью линейного градиента(от 0% до 25%) конечного буфера В(20 объемов колонки) (1М NaCl в буфере А). Элюат исследуют при 280нм. Фракции, содержащие поли-МеPEG-MGDF-конъюгат, объединяют, концентрируют и стерилизуют фильтрованием.

Гомогенность моно-МеPEG-MGDF-конъюгата подтверждают гелеэлектрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии SDS при использовании 4 - 20% градиентного геля фирмы NOVEX. Выявляют одну главную полосу, соответствующую белку с мол.массой 46,9кД.

Очищенный поли-МеPEG-MGDF-конъюгат анализируют с помощью SEC HPLC при использовании геле-фильтрационных колонок TSK-GEL 64000SWXL и 62000 SWXL, объединенных в серии. Белки выявляют по поглощению в ультрафиолете при 280нм. В качестве маркеров молекулярной массы глобулярных белков используют геле-фильтрационные стандарты BIO-RAD.

Как можно видеть на фиг.17С, с помощью SEC HPLC в препарате выявляется один основной компонент, причем его точка элюции соответствует глобулярному белку мол.массы 181.1кД(см. также Табл.9).

Моно-МеPEG-MGDF-конъюгаты PEG14, PEG15 и PEG17, полученные путем восстановительного алкилирования MGDF с альдегидами МеPEG мол.массы 6 - 25кД, исследуют аналогичным образом. Основные параметры реакций, используемых для получения соответствующих препаратов, приведены в Таблице 7.

Результаты исследований полученных конъюгатов с помощью SEC HPLC приведены в Таблице 9.

Таблица 7

Параметры реакций модификации MGDF

Код	Реагент МеPEG				Условия реакции		
	Тип	Мол. вес	Конц MGDF. мг/мл	рН	Темп. °С	Время, час.	Молярное соотн. МеPEG/MGDF
PEG 9	NHS-эфир	6кД	2,5	8	комн.	0,5	15
PEG 10	NHS-эфир	6кД	2,5	8	комн.	0,5	10
PEG 11	NHS-эфир	20кД	2,5	8	комн.	0,5	10
PEG 12	NHS-эфир	50кД	2,5	8	комн.	0,5	5
PEG 14	альдегид	6кД	2,5	5	4°С	16	5
PEG 15	альдегид	12кД	2,5	5	4°С	16	5
PEG 16	альдегид	20кД	2,5	5	4°С	16	5
PEG 17	альдегид	25кД	2,5	5	4°С	16	10
PEG 18	альдегид	6кД	5	5	4°С	16	10
PEG 19	альдегид	12кД	5	5	4°С	16	10
PEG 20	альдегид	20кД	5	5	4°С	16	10
PEG 21	альдегид	25кД	5	5	4°С	16	10

Таблица 8

Характеристики поли-МеPEG-MGDF, полученные SEC HPLC

Код	Реагент	МеPEG	Мол.вес по SEC, кД	Количество компонента, %
PEG 9	NHS-эфир	6кД	87,9	75
			52,7	25(плечо)
PEG 10	NHS-эфир	6кД	69,2	14(плечо)
			42,9	86
PEG 11	NHS-эфир	20кД	370,9	68
			155,0	32
PEG 12	NHS-эфир	50кД	865,6	53
			368,0	47
PEG 18	альдегид	6кД	84,6	60
			41,5	40
PEG 19	альдегид	12кД	218,4	59
			106,7	41
PEG 20	альдегид	20кД	359,4	52
			159,3	47
PEG 21	альдегид	25кД	450,5	54

			218,4	46
--	--	--	-------	----

Таблица 9

Приблизительные молекулярные веса конъюгатов моно-MePEG-MGDF

Код	Реагент, тип	MePEG мол.вес	Мол.вес по SEC, кД	Мол. вес по SDS-PAGE, кД
PEG 14	альдегид	6кД	44,5	27,7
PEG 15	альдегид	12кД	104,7	38,3
PEG 16	альдегид	20кД	181,1	46,9
PEG 17	альдегид	25кД	226,4	55,5

12.4.Получение DiMePEG(12кД)-MGDF-конъюгатов путем алкилирования MGDF с альдегидом метокси-полиэтиленгликоля(PEG20) в восстанавливающих условиях

Описанная ниже методика приводит к получению очищенного соединения, называемого здесь PEG22. 5-кратный избыток альдегида метоксиполиэтиленгликоля(MePEG, например, $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_2\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ (где n повторяется столько раз, чтобы мол.масса составляла около 12кД) (Shearwater Polymers) добавляют к 2,5мг/мл раствора MGDF(полученного в E.coli, 1-163) в 100мм ацетата натрия, pH 5, охлажденного до 5°C. После 10-минутного перемешивания добавляют соответствующее количество цианоборогидрида натрия(Aldrich), чтобы его концентрация в реакционной смеси составила 20мМ.

Полученную смесь перемешивают в течение 16 часов при температуре 5°C. По окончании указанного периода времени концентрацию MGDF устанавливают на уровне 1мг/мл путем добавления в достаточной степени очищенной воды. Затем смесь фильтруют через вакуумный фильтр с размером пор 0,2 микрона. По указанной методике получают 90мг реакционного продукта. К смеси, содержащей реакционный продукт, добавляют небольшие количества растворов 1,0М одноосновного фосфата и 1 N гидроксида натрия, чтобы получить раствор, содержащий 10мм фосфата при pH 6,8.

Конъюгат очищают на катионообменной колонке. Готовят 40-мл колонку, заполненную SP-Сефарозой для хроматографии высокого разрешения, длиной 7,5см. Колонку уравнивают соответствующим буфером(10мм фосфат, pH 6,8, 15% глицерина). Колонку загружают 2,2мг/мл смолы при скорости потока 0,15 объемов колонки(CV) в минуту. Затем колонку промывают уравнивающим буфером до достижения нулевой точки отсчета. Колонку элюируют лнейным градиентом от буфера А(10 объемов колонки, 20мм фосфат, pH 7,2, 15% глицерина) к буферу В(буфер А и 0,3М NaCl). Скорость потока поддерживается на уровне 0,15 CV. Элюат исследуют при 280нм.

Полиакриламидные гели, содержащие SDS, разделяют на фракции и те из них, которые содержат конъюгат DiPEG, объединяют и фильтруют через ячейку с размером пор 0,2 микрона.

Пример 13. Биологическая активность пэгированных молекул MGDF

А. PEG-9 - PEG-12 и PEG-14 - PEG-21

Количество тромбоцитов у мышей, обработанных рекомбинантным MGDF человека, отражено на фиг.18. Полученный в клетках CHO MGDF(22-353) (открытые звездочки), непэгированный MGDF, полученный в E.coli(22-184) (незакрашенные кружки) и пэгированный MGDF, полученный в E.coli(22-184) (закрашенные кружки) в концентрациях, указанных в описании рисунков выше, вводили подкожно нормальным мышам Balb/c раз в день в течение 5 дней. Через 24 часа после последнего введения брали контрольные образцы крови из небольшого бокового разреза хвостовой вены. Анализы клеток крови проводили при помощи электронного анализатора клеток крови Sysmex(Baxter Diagnostics.Inc. Irvine, CA). Приведены средние данные по четырем животным +/-стандартное отклонение. Данная обработка не оказывала влияния на другие параметры клеток крови, такие как общее количество красных и белых клеток крови.

Другие формы рекомбинантного MGDF человека тестировали как описано выше. Количество тромбоцитов у мышей, получавших 50мкг/кг/день или 10мкг/кг/день указанной формы r-HuMGDF, приведено в Таблице 10. Представленные значения являются средними по четырем животным и стандартные ошибки даны курсивом.

Таблица 10

	50мкг/кг/день	Станд. отклонение	10мкг/кг/день	Станд. отклонение
Форма	Среднее значение(n=4)		Среднее значение(n=4)	
CHO22-353	4343	309	2571	80
E.coli 22-184	2021	29	1439	18
ПЭГ 9	2728	56	2369	34
ПЭГ 10	2431	291	1556	126
ПЭГ 11	3778	59	1861	73
ПЭГ 12	3885	156	1740	88
ПЭГ 14	3567	80	2020	63

ПЭГ 15	4402	57	2834	99
ПЭГ 16	4511	239	3215	11
ПЭГ 17	4140	188	3113	261
ПЭГ 18	4586	59	2931	129
ПЭГ 19	3980	330	4189	80
ПЭГ 20	3942	285	3054	339
ПЭГ 21	4195	145	4002	91
Точка отсчета	939	25		

Ключ к таблице 10.

В каждом случае молекулой MGDF, которую подвергали пэгированию, была полученная в E.coli MGDF-11(амнокислоты 22-184, при нумерации от сигнального пептида, или аминокислоты 1-163, при нумерации от начала зрелого белка), как это описано выше в Примере 12.

Название	Пэгирование	Средний мол, вес ПЭГа	Реактивная молекула ПЭГ для синтеза
ПЭГ 9	полипэгирован	6кД	NHS-эфир MePEG
ПЭГ 10	полипэгирован	6кД	NHS-эфир MePEG
ПЭГ 11	полипэгирован	20кД	NHS-эфир MePEG
ПЭГ 12	полипэгирован	50кД	NHS-эфир MePEG
ПЭГ 14	монопэгирован	6кД	альдегид MePEG
ПЭГ 15	монопэгирован	12кД	альдегид MePEG
ПЭГ 16	монопэгирован	20кД	альдегид MePEG
ПЭГ 17	монопэгирован	25кД	альдегид MePEG
ПЭГ 18	полипэгирован	6кД	альдегид MePEG
ПЭГ 19	полипэгирован	12кД	альдегид MePEG
ПЭГ 20	полипэгирован	20кД	альдегид MePEG
ПЭГ 21	полипэгирован	25кД	альдегид MePEG

За точку отсчета принимали значения для нормальных животных без введения какого-либо материала.

Очевидно, что пэгирование рекомбинантного MGDF человека не уменьшает его активности увеличивать количество тромбоцитов у животных-реципиентов и может фактически увеличивать активность продукта E.coli 22-184 до активности, равной или даже большей активности продукта CHO 22-353.

Б. ПЭГ-22

Результаты, полученные с ПЭГ-22, представлены на фиг.24. Примечательно, что нормализация количества тромбоцитов с ПЭГ-22 наступала на несколько дней раньше, чем с полноразмерным полученным в CHO MGDF ПЭГ-16 или ПЭГ-17.

Пример 14. Экспрессия рекомбинантного MGDF человека(1-163) в E.coli

Для экспрессии r-HuMGDF в E.coli с использованием оптимальных кодонов E.coli была химически синтезирована последовательность, кодирующая первые 163 аминокислоты зрелого белка. Кроме того, последовательности ДНК, кодирующие аминокислоты Метионин и Лизин, были добавлены к 5'-концу гена. Таким образом, белок r-HuMGDF, состоящий из 165 аминокислот, начинался с Met-Lys. Последовательность этого гена приведена на фиг.25.

Синтез гена r-HuMGDF(1-163) проводили в несколько этапов. Во-первых, с использованием оптимальных кодонов E.coli были химически синтезированы комплементарные олигонуклеотиды(длиной 60-70 пар оснований), представляющие фрагменты, прилегающие к гену. Во время этого синтеза кодоны для аминокислот Метионина и Лизина были помещены на 5'-конец зрелого гена и стоп-кодон был помещен на 3'-конец гена. Кроме того, сайты узнавания ферментов рестрикции XbaI и HindIII были помещены в близости к 5' и 3' концам гена соответственно и синтетический сайт связывания рибосом был помещен на соответствующем расстоянии выше от начального Метионина. Во-вторых, были гибридизованы олигонуклеотиды, комплементарные каждому фрагменту гена. В третьих, эти индивидуальные синтетические фрагменты гена были амплифицированы в полимеразной цепной реакции. Вчетвертых, амплифицированные фрагменты субклонировали в соответствующий вектор. В-пятых, верифицировали последовательности субклонированных фрагментов. В-шестых, индивидуальные фрагменты лигировали вместе и субклонировали в соответствующий вектор, восстанавливая полноразмерный ген r-HuMGDF(1-163). Наконец, верифицировали последовательность восстановленного гена.

Синтетический фрагмент r-HuMGDF гена, фланкированный сайтами рестрикции XbaI и HindIII с 5' и 3' концов соответственно, содержал сайт связывания рибосом, иницирующий кодон ATG, последовательность, кодирующую зрелый белок Met-Lys r-HuMGDF, и стоп-кодон.

Указанный фрагмент был клонирован по сайтам XbaI и HindIII в лактозоиндуцируемый вектор экспрессии pAMG11. Вектор pAMG11 - это низкокопийная плазмида с началом репликации, полученным из pR100. Экспрессирующая плазмида pAMG11 может быть получена из плазмиды pCFM1656(депонирована

24 февраля 1994 в Американской коллекции культур клеток, ATCC # 69576) путем ряда направленных замен оснований при перекрывании олигонуклеотидов в полимеразной цепной реакции. Начиная с сайта BglII(в плазмиде пара оснований # 180) непосредственно в 5'-направлении к промотору репликации плазмиды PcorB и далее по направлению к репликативным генам плазмиды, замены пар оснований были таковы:

пары в рAMG11 пара в рCFM1656 пара,замененная в рAMG11

# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	--	вставка двух G/C
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1486	G/C	T/A
# 2028	G/C	делеция пары
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	<u>AGTG</u>	<u>GTCA</u>
	TCAC	CAGT
# 2642	<u>TCCGAGC</u>	делеция пары
	AGGCTCG	
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A
# 4489-4512	--	вставка пар:

GAGCTCACTAGTGTGACCTGCAG
CTCGAGTGATCACAGCTGGACGTC

(SEQ ID NOS: 30,31)

с заменой последовательности ДНК между уникальными сайтами AatII и ClaI следующим олигонуклеотидом: AatII(#4358)

5' CTCATAATTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTCCTT-
3' TGCAGAGTATTAAAAATTTTAAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAGAA-
-GATTAATATTCTCAATTGTGAGCTCACAATTTAT 3'
-CTAATTATAAGAGTTAACTCGAGTGTTAAATAGC 5'
ClaI (#4438)

(SEQ ID NOS: 32,33)

Экспрессия r-HuMGDF, клонированного в рAMG11, направляется синтетическим лактозо-индуцируемым промотором, подобным Ps4, который имеет следующую последовательность:

5' GACGTCTCATAATTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAA-
-ATTCTTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCTCACAATTTATCGAT 3'

(SEQ ID NO: 34).

Промотор Ps4 подавляется лактозным репрессором(Lad), продуктом гена lac E.coli.

Затем плазмидой рAMG11-r-HuMGDF трансформировали клетки E.coli штамма K-12, имеющие lacIq-аллель. Аллель lacIq представляет собой такую мутацию промотора lacI, которая усиливает экспрессию LacI, что приводит к более строгому контролю экспрессии белка со стороны промотора Ps4. Таким образом в клетках данного штамма в отсутствие лактозы экспрессия r-HuMGDF подавлена LacI. При добавлении лактозы связывание LacI-белка с операционным сайтом на промоторе Ps4 снижается и начинается транскрипция r-HuMGDF с Ps4. Вспользованные в данном примере клетки-хозяева E.coli депонированы под номером ANNC # 69717 30 ноября 1994г.

Клетки E.coli ATCC # 69717 трансформировали плазмидой рAMG11-r-HuMGDF и выращивали

согласно следующему протоколу. Штамм *E.coli* инокулировали в бульон Лурии и инкубировали при 30°C приблизительно 12 часов. Затем клетки асептически переносили в ферментор, который содержал среду следующего состава: 20г/л дрожжевого экстракта; 3,4г/л лимонной кислоты; 15г/л K_2HPO_4 ; 15мл Dow P2000; 5г/л глюкозы; 1г/л $MgSO_4 \times 7H_2O$. Первая фаза процесса культивирования(batch-phase) продолжалась до тех пор, пока культура не достигала оптической плотности 5.0 +/- 1.0 при 600нм. Затем начиналась фаза подпитки(fed-batch) с подачи первой подпитывающей среды(700г/л глюкозы; 6,75г/л $MgSO_4 \times 7H_2O$). Скорость подпитки регулировали каждые два часа согласно установленному графику. Подача второй подпитывающей среды(129г/л триптиканого пептина; 258г/л дрожжевого экстракта) начиналась при достижении культурой оптической плотности 20-25 при 600нм. Подачу второй подпитывающей среды поддерживали на постоянном уровне, тогда как подача первой подпитывающей среды продолжала меняться. Температуру во время всего процесса ферментации поддерживали около 30°C. Значение pH в культуре поддерживали около 7 добавлением кислоты или щелочи. Желаемый уровень растворенного кислорода поддерживали, изменяя скорость перемешивания и скорости подачи воздуха и кислорода в ферментор. Когда оптическая плотность культуры достигала 57-63 при 600нм, начинали подачу третьей подпитывающей среды. Третью подпитывающую среду(300г/л лактозы) вводили в ферментор с постоянной скоростью тока; добавление первой подпитывающей среды в этот момент прекращали, а скорость подачи второй подпитывающей среды устанавливали на другом постоянном уровне. Ферментацию продолжали приблизительно десять часов с начала добавления третьей подпитывающей среды. По окончании ферментации культуру охлаждали до 15 +/- 5°C. Клетки собирали центрифугированием. Полученную пасту фасовали и хранили при температуре ниже -60°C.

Очистку рекомбинантного MGDF, полученного в *E.coli* как описано выше, проводили следующим образом. 1800г клеточной пасты суспендировали приблизительно в 18 литрах 10мм раствора ЭДТА и пропускали через гомогенизатор высокого давления при 15000 psi. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали и осадок ресуспендировали в 10 литрах 10мм ЭДТА. Суспензию центрифугировали и полученный при 200g осадок солибилизовали в 2 литрах буфера следующего состава: 10мм Tris, 8М гуанидин гидрохлорид; 10мм дитиотрейтол, pH 8,7. Объем данного раствора медленно доводили до 200 литров добавлением следующего раствора: 10мм CAPS; 3М мочевины; 30% глицерин; 3мм цистамин; 1мм цистеин, pH 10,5. Разбавленный раствор медленно перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов и pH доводили до 6,8. Затем раствор с доведенным pH осветляли и наносили на 2-х литровую колонку CM Sepharose, уравновешенную 10мм фосфат натрия, 1,5 М мочевины, 15% глицерин, pH 6,8. После загрузки колонку промывали 10мм фосфат натрия, 15% глицерин, pH 7,2. MGDF элюировали градиентом хлорида натрия от 0 до 0,5 М, 10мм фосфат натрия, pH 7,2.

Элюат концентрировали и заменяли буфер на 10мм фосфат натрия, pH 6,5 при помощи мембраны с порогом отсека по молекулярному весу 10000. Концентрированный раствор(около 2мг/мл) обрабатывали катепсином С(молярное соотношение 500 к 1) в течение 90 минут при подходящей температуре. Затем раствор наносили на 1,2-литровую колонку SP High Performance Sepharose, уравновешенную 10мм фосфат натрия, 15% глицерин, pH 7,2. MGDF элюировали градиентом хлорида натрия от 0,1 до 0,25 М, 10мм фосфат натрия, pH 7,2.

К элюату с колонки SP High Performance Sepharose добавляли сульфат аммония до концентрации 0,6 М. Затем элюат наносили на 1,6-литровую колонку с Phenyl Toyopearl, уравновешенную 10мм фосфат натрия, 0,6 М сульфат аммония, pH 7,2. Пик MGDF элюировали градиентом сульфата аммония от 0,6 до 0 М, 10мм фосфат натрия, pH 7,2.

Элюат с Phenyl Toyopearl концентрировали и заменяли буфер на 10мм Tris, 5% сорбитол, pH 7,5 при помощи мембраны с порогом отсека по молекулярному весу 10000.

Пример 15. Биологические свойства r-HuMGDF(*E.coli* 1-163) in vivo

Биологическую эффективность r-HuMGDF(*E.coli* 1-163), полученного как описано выше в Примере 14, оценивали на грызунах. Нормальным самкам мышей Balb/c в течение пяти последовательных дней вводили подкожно возрастающие дозы r-HuMGDF. Дозы варьировали от 15мкг/кг/день до 1500мкг/кг/день. Спустя 24 часа после последнего введения проводили подсчет клеток крови с использованием электронного счетчика клеток(Sysmex, Baxter). Наблюдалось линейное возрастание количества тромбоцитов, параллельное логарифмическому возрастанию концентрации цитокина. В данной системе при дозе 1500мкг/кг/день количество тромбоцитов возрастало до 300% по отношению к исходному. Другие показатели клеток крови, такие как количество красных и белых клеток или гематокрит, не менялись в ходе данной обработки.

Крысам вводили подкожно r-HuMGDF(*E.coli* 1-163) в дозах 300мкг/кг/день в течение 6 дней, затем у них брали тромбоциты и определяли способность последних агрегировать в ответ на ADP. Показано, что тромбоциты обработанных животных практически неотличимы от тромбоцитов контрольных животных по чувствительности к агонисту тромбоцитов, ADP.

Оценивали также способность r-HuMGDF корректировать тромбоцитопению, обусловленную химиотерапией и/или облучением. В данных опытах использовали карбоплатин, химиотерапевтический агент, способный вызывать у человека глубокую тромбоцитопению. В начале опыта мышам Balb/c вводили подкожно по 1,25мг карбоплатина. Спустя 24 часа начинали ежедневные инъекции 100мкг/кг/день r-HuMGDF(*E.coli* 1-163) или, в контроле, растворителя. К девятому дню количество тромбоцитов падало до 15% от нормального у мышей, получавших один растворитель, но оставалось в пределах нормы у мышей, получавших r-HuMGDF(см. фиг.20). В опытах с облучением мыши получали однократную дозу в 500рад гамма-облучения(цезиевый источник). Эта сублетальная доза приводила к снижению числа тромбоцитов на 90% к 11-му дню. Количество тромбоцитов не возвращалось к нормальному до 21-го дня. При введении

облученным мышам с 1-го по 20-й день ежедневно по 100мкг/кг/день r-HuMGDF(E.coli 1-163) уменьшение числа тромбоцитов было менее резким и возвращение к их нормальному числу более быстрым, нежели у мышей, получавших один растворитель(фиг.21). Для проверки r-HuMGDF на модели острой и пролонгированной тромбоцитопении, была применена комбинация карбоплатина и облучения(фиг.22). В этом случае количество тромбоцитов снижалось до крайне низких уровней(3-5% от нормы) и большинство животных(7/8) не переживали такой обработки. Однако, когда животным подкожно ежедневно вводили по 100мкг/кг/день r-HuMGDF в течение всего эксперимента, тромбоцитопения в значительной степени корригировалась, возврат к исходному числу тромбоцитов происходил быстрее и все получавшие r-HuMGDF животные(8/8) выживали.

r-HuMGDF проверяли также на макаках резус. Нормальным макакам резус вводили подкожно препарат r-HuMGDF в дозах 2,5 или 25мкг/кг/день в течение десяти дней(дни 0-9). В группе, получавшей низкую дозу, количество тромбоцитов возросло до 400% от нормы к 12-му дню, а в группе, получавшей высокую дозу, увеличение составило 700% также к 12-му дню. По окончании инъекций количество тромбоцитов возвращалось к норме к 25-30-му дню. Данная обработка не влияла на количество белых и красных клеток крови.

r-HuMGDF был также проверен на модели приматов с острой тромбоцитопенией(фиг.23). Облучение животных(700рад, цезиевый источник) приводило к снижению числа тромбоцитов до 1-2% от нормы к 15-му дню. На 35-40-й день число тромбоцитов возвращалось к норме. У облученных животных, которым вводили r-HuMGDF(25мкг/кг/день), количество тромбоцитов снижалось только до 10% от нормы и в среднем не опускалось ниже 20000/мл, значения, при котором начинают трансфузию тромбоцитов людям, страдающим тромбоцитопенией. Возврат к нормальному числу тромбоцитов также происходил более быстро у животных, получавших r-HuMGDF, и наступал на 20-й день.

Приведенные данные экспериментов *in vivo* на грызунах и приматах полностью поддерживают концепцию о том, что r-HuMGDF(E.coli 1-163) является мощным терапевтическим агентом, способным значительно влиять на встречающиеся в клинике тромбоцитопении.

Пример 16. Метод получения r-HuMGDF(1-332) в культуре клеток CHO

Гликозилированный r-HuMGDF 1-332 продуцируется трансфицированными клетками CHO, экспрессирующими кДНК MGDF 1-332 под регуляцией подходящего промотора и соединенный с геном, кодирующим амплифицируемый селективный маркер, DHFR. Подходящим промотором для экспрессии MGDF в клетках CHO является промотор SR-alfa. См. Mol.Cell.Biol. 8: 466- 472(1988) и патент WO 91/13160(1991). Подходящим вектором для экспрессии MGDF в клетках является pDSR-alfa2. См. WO 90/14363(1990). Клеточные линии CHO могут продуцировать секретируемый MGDF в количестве 10-20мг/л в стандартной культуральной среде, но уровень продукции может быть повышен от 25 до 100мг/л. При продукции MGDF в типичной клеточной линии культура может быть "разогнана" пассажами в суспензии или на культуральных флаконах(в случае субстрат-зависимого роста) с использованием культуральной среды, состоящей из равных количеств среды Игла в модификации Дальбекко(DMEM) и среды Хэма F12(DMEM/F12, Gibco) с добавлением от 5 до 10% эмбриональной телячьей сыворотки(FBS) или диализованной эмбриональной телячьей сыворотки и метотрексата(MTX)(при необходимости; обычная концентрация MTX составляет 200-600нМ) для поддержания селективного давления. В среду должны быть дополнительно добавлены не-необходимые аминокислоты(NEAA's) и глутамин. Суспензионные культуры могут быть наращены в пределах концентраций $1-4 \times 10^5$ клеток/мл(посевная концентрация) до приблизительно 1 миллион клеток/мл. При достижении максимальной концентрации клеток производят пассаж культуры путем разбавления до больших объемов и достижения посевной концентрации.

При получении MGDF в роллерных флаконах, подходящий объем и плотность клеток в суспензионной культуре должны быть подобраны с использованием спиннерных флаконов с магнитными мешалками, помещенных в термостатированные условия($37 \pm 1^\circ\text{C}$), или же с использованием автоматической контролируемой системы с биореактором. Роллерные флаконы(например, флаконы фирмы Falcon площадью 850см²) должны засеваться клетками с посевными дозами от $1,5$ до 3×10^7 клеток на флакон в таком количестве ростовой среды(DMEM/F12 с 5-10% FBS, 1хNEAA и 1х глутамин), которое обеспечивало бы образование слитого монослоя на 3-4-й день культивирования(150-300мл). Ростовая среда должна быть забуферена бикарбонатом натрия до pH 6,9-7,2 и уравновешена двуокисью углерода до парциального давления 60-90мм ртутного столба. Флаконы должны быть заполнены смесью 10% CO₂ в воздухе и культуры инкубируют при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ на роллерных аппаратах при скорости вращения около одного оборота в минуту в течение 3-4 дней. При достижении монослоя коллерные культуры должны быть переведены на бессывороточную производственную среду. При этом старую ростовую среду сливают или отсасывают, культуры промывают изотоническим буфером, например фосфатным буферным раствором Дальбекко(D-PBS), 50-100мл на флакон, затем добавляют соответствующий объем забуференной бикарбонатом бессывороточной среды DMEM/F12(1:1)(200-300мл на флакон) с добавлением NEAA, глутамина и сульфата меди(1-20мкМ) для минимизации ковалентной агрегации. Флаконы заполняют газовой смесью(10% CO₂ в воздухе) и инкубируют 6 ± 1 дней при 37°C на роллерных аппаратах(~ 10 об/мин) или же до такого момента, когда в результате метаболизма клеток уровень глюкозы в среде опустится ниже 0,5г/л и/или значение pH опустится ниже 6,6. Кондиционированную среду сливают или отсасывают из флаконов и заменяют свежей бессывороточной производственной средой указанного выше состава для получения дополнительных сборов. Так может продолжаться до тех пор, пока клетки не смогут более переносить бессывороточные условия и не начнут сползать с роллерных флаконов.

Собранную кондиционированную среду очищают микрофильтрацией через фильтры с размером пор 0,45 или 0,2мкм(Sartorius Sartobran pH или Pall).

Профильтрованную кондиционированную среду охлаждают до 4°C и хранят непродолжительное время при этой температуре или немедленно концентрируют и диализуют против буфера с низкой ионной силой с использованием тангенциальной ультрафильтрационной системы (например, Filtron YM-50). Ультрафильтрацию и диализацию необходимо проводить при 4°C, чтобы минимизировать деградацию белка. До хроматографической очистки кондиционированная среда должна быть диализована против буферного раствора (например, 10мМ фосфат калия, pH 6,8).

Качество продукта, содержащегося в кондиционированной среде лучше всего контролировать при помощи SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях с последующим Вестерн-блоттингом, который может выявить количества агрегированного, мономерного и протеолитически деградированного MGDF в образцах.

Другой метод получения MGDF в клетках CHO состоит в адаптации клеточной линии, экспрессирующей MGDF, к бессывороточной среде, такой как Gibco S-SFM II. Клетки могут быть адаптированы серийными пассажами на среде, содержащей минимум сыворотки или не содержащей ее совсем. Если клеточная линия будет устойчиво расти на такой среде и продуцировать адекватные количества секретируемого MGDF, культивирование может продолжаться путем серийных пассажей, в возрастающих объемах, затем клетки переносят в подходящий производственный сосуд (автоматический контролируемый биореактор) и культуре дают пролиферировать до достижения максимальной плотности, при которой клетки еще жизнеспособны, при оптимальных ростовых условиях (pH, питательные вещества, температура, кислород, разрушение клеток). В точке оптимальной продукции (которую определяют экспериментально, замеряя количество и качество продукта) культуру собирают из биореактора, клетки удаляют из кондиционированной среды микронной глубинной фильтрацией или субмикронной тангенциальной микрофильтрацией. В случае глубинной микронной фильтрации среда должна быть впоследствии осветлена субмикронной конечной фильтрацией для концентрации и диализа, как это описано выше.

Несмотря на то, что заявленное изобретение описано выше как в целом, так и в отношении конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что модификации изобретения на основе приведенного описания могут быть воспроизведены любым специалистом в данной области исследований. Таким образом, заявленные пункты формулы в действительности охватывают все варианты изобретения, входящие в его объем.

Кроме того, публикации и другие информационные источники, приведенные для оценки уровня техники и лучшего понимания описания изобретения, в особенности для более подробного освещения практических вопросов, включены в материалы заявки в качестве ссылок.

Список последовательностей

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ: Bartley, Timothy D.
Bogenberger, Jakob M.
Bosselman, Robert A.
Hunt, Pamela
Kinstler, Olaf B.
Samal, Babru B.

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Способы и препараты для стимуляции роста и дифференцировки мегакариоцитов.

(iii) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 34

(iv) АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

(A) АДРЕСАТ: Amgen Inc.
(B) УЛИЦА: 1840 Dehavenland Drive
(C) ГОРОД: Thousand Oaks
(D) ШТАТ: California
(E) СТРАНА: USA
(F) ПОЧТОВЫЙ КОД: 91320-1789

(v) ФОРМА ДЛЯ РАБОТЫ С КОМПЬЮТЕРОМ:

(A) НОСИТЕЛЬ ИНФОРМАЦИИ: Дискета
(B) КОМПЬЮТЕР: IBM-совместимый
(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0
Version # 1.25

(vi) ТЕКУЩИЕ ДАННЫЕ ПО ЗАЯВКЕ:

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ:
(B) ДАТА ПОДАЧИ:
(C) КЛАССИФИКАЦИЯ:

(vii) ИНФОРМАЦИЯ О ПРЕДСТАВИТЕЛЕ:

(A) ИМЯ: Cook, Robert R.
(C) РЕФЕРЕНС/ДОКЕТ НОМЕР: A-290-C

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 31 аминокислота
(B) ТИП: аминокислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:1:

Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Met Leu Arg Asp
1 5 10 15
Ser His Val Leu His Xaa Arg Leu Xaa Gln Xaa Pro Asp Ile Tyr
20 25 30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 аминокислота
- (B) ТИП: аминокислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 2:

Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Met Leu Arg Asp
1 5 10 15
Ser His Val Leu His
20

(4) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 17 аминокислот
- (B) ТИП: аминокислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

Thr Gln Lys Glu Gln Thr Lys Ala Gln Asp Val Leu Gly Ala Val Ala
1 5 10 15

(5) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 17 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:4:

GCNCCNCCNG CNTGYGA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 пара оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:5:

GCARTGYAAC ACRTGNGART C

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 аминокислота
- (B) ТИП: аминокислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ : SEQ ID NO: 6

Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg
1 5 10 15
Asp Ser His Val Leu His
20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 пара оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:7:

GTACGCGTTC TAGANNNNNN T

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 пара оснований

- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:8:

AGTTTACTGA GGACTCGGAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:9:

TTCGGCCCGGA TAGGCSTTTT TTTT TTTT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 29 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:10:

TTCGGCCCGGA TAGGCSTTTT TTTT TTTT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:11:

TGCGACSTCC GAGTCCTCAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 23 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:

GAGTCCTCAG TAAAGTGCTT CGT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:

GGAGTCA CGA AGCAGTTTAC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 18 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:14:

ССТТТАСТТС TAGGCSTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:15:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 19 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:15:

GAGGTCACAA GCAGGAGGA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:16:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 19 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:16:

GGCATACTCC GGGACGTCG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 19 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:17:

TCCTCCTGCT TGTAGCCTC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 19 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:18:

CCAGGAAGGA TTCAGGGGA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:19:

CAACAAGTCG ACCGCCAGCC AGACACCCCG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 24 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:20:

GGCCGGATAG GCCACTCANN NNNT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:21:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 21 пара оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:21:

GCARTGYAAN ACRTGNGART C

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:22:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 16 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:22:
TTGGTGTGCA CTTGTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:23:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 20 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:23:

CACAAGTGCA CACCAACCCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:24:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 1342 пары оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ix) ХАРАКТЕРИСТИКА:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS
(B) ЛОКАЛИЗАЦИЯ: 99..1094

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:24:

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA
TTGCTCCTCG 60

TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT 113
Ser Pro Ala Pro Pro
1 5

GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val
10 15 20

CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
25 30 35

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA
TTGCTCCTCG 60

TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT 113
Ser Pro Ala Pro Pro
1 5

GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val
10 15 20

CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
25 30 35

CCT GTG CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC
 Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr
 40 45 50

CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT
 Gln Met Glu Gln Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
 55 60 65

CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC
 Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys
 70 75 80 85

CTC TCA TCC CTD CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT
 Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu
 90 95 100

GGG GCC CTG CAG ACC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AAG
 Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg
 105 110 115

ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAG
 Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His
 120 125 130

CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC
 Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr
 135 140 145

CTC TSC GCT AGG GGG GGC DCA CCC ACC ACA GCT GCT CCC AGC AGA ACC
 Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr
 150 155 160 165

TCT CTA GCT CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG
 Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu
 170 175 180

TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT
 Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu
 185 190 195

CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GGC AAG ATT CCT GGT CTG CTG AAC
 Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn
 200 205 210

CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC CTG AAC AGG ATA
 Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile
 215 220 225

CAC GAA CTC TTC AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT GGA CCC TCA CGC
 His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg
 230 235 240 245

AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA GGA ACA TCA GAC ACA GGC
 Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Tyr Gly
 250 255 260

TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT TCC CCA ACC CAT
 Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His
 265 270 275

CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA CCC ACC TTG CCC
 Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro
 280 285 290

ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC CCT TCT GCT CCA
 Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro
 295 300 305

ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC TAC ACC CAC TCC
 Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser
 310 315 320 325

CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGTTCTC AGACACTGCC GACATCAGCA 1124
 Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 330

TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCTG GGAGACAAC
 GGACAAGATT

TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA TACACAGGAC TGAAAAGGGA

ATCAFTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT TTTTAAGCT ATCAGCAATA

CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTGCTGTAT TTTCTGCA 1342

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO:25:

(I) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 332 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: белок

(XI) Описание последовательности SEQ ID NO:25;

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
 20 25 30
 His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
 35 40 45
 Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
 50 55 60
 Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
 85 90 95
 Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
 100 105 110
 Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 115 120 125
 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
 130 135 140
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Thr Thr Thr Ala
 145 150 155 160
 Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn
 165 170 175
 Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr
 180 185 190
 Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Thr Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile
 195 200 205
 Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
 245 250 255
 Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser
 260 265 270
 Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu
 275 280 285
 Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
 290 295 300
 Asn Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr
 305 310 315 320
 Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 325 330

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO:26:

(I) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 1342 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(C) Количество цепей: одна

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: белок

(IX) Характеристика

(A) Имя/ключ: CDS

(B) Локализация: 99..621

(XI) Описание последовательности SEQ ID NO:26;

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA 50

TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC
Ser
1

CCG GCT CCT CCT
Pro Ala Pro Pro
5

GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val
10 15 20

CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
25 30 35

CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC
Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr
40 45 50

CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT
Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
55 60 65

CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC
Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys
70 75 80 85

CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu
90 95 100

GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG
Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg
105 110 115

ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC
Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His
120 125 130

TG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC
Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr
135 140 145

CTC TGC GTC AGG CCG GGC CCA CCC ACC ACA GGT GTC CCG AGC AGA ACC
Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr
150 155 160 165

TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAG GAG CTC C CAACACGGAC TTCTGGATTG 841
Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
170

TTGGAGACAA ACTTCACTGC CTCATCGAGA ACTACTGGCT CTGGGCTTCT
GAAGTGGCAG

CAGGGATTCA GAGCCAGAT TCTTGGTCTG CTGAACCAAA COTCCAGGTC
CCTGGACCAA

ATCCCECGAT ACCTSAACAG GATACACGAA CTCTTGAATG GAACCTGTGG ACTCTTTCTT

GGACCTTCAG GCAGGACTCT AGGAGCCCGG GACATTCTCT GAGGAACATC
AGACACAGGG

TCCCTGCCAC CCAACCTCCA GCTCGATAT TCTCTTCCG CAACCGATCC TCTACTGGA

CAGYATAGGC TCTTCTCTCT TCCACCCAGC TTGCCACCC GTGTGGTCCA
GTCCACCCC

CTGCTTCTG AOCCTTCTG TCCAAAGCCC AOCCTACCA GOCCTCTTCT AAACAGATCC

TACACCACT CCCAGATCT GTCTCAGGAA GGGTAAGTT CTCAGACACT GCGACATCA

GCATTGTCTG GTGTACAGCT CCGTCCCTG CAGGGGSECC CTGGGAGACA
AATGGACAAG

ATTTCCTACT TTCTCTGAA AOCCAAAGCC CTGTAAAG GGATACACAG GACTGAAGAG

GGAACTATT TTCACTGTAC ATTATAACC TTCAGAGCT ATTTTTTAA GCTATCAGCA

ATACTCATCA GAGCAGCTAG CTCTTTGGTC TATTTCTGC A 1342

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO:27:

(I) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 174 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: белок

(XI) Описание последовательности SEQ ID NO:27;

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
1 5 10 15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
20 25 30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
35 40 45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65 70 75 80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
85 90 95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
100 105 110

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

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
130 135 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
145 150 155 160

Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
165 170

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO:28:

(I) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 1164 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: кДНК

(XI) Описание последовательности SEQ ID NO:28;

AGGGAGCCAC GCCAGCCACA CACCCCGGCC AGAATGGAGC TGAAC TGAATT
GCTCCTCGTG

GT CATGCTTC TCCTAACTGC AAGGCTAACG CTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT
Ser Pro Ala Pro Pro Ala
1 5

TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT
Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu
10 15 20

CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT
His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro
25 30 35

GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG
 Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
 40 45 50

ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG
 Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu
 55 60 65 70

CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC
 Leu Glu Gly Val Met Al Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu
 75 80 85

TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG
 Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly
 90 95 100

GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC
 Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr
 105 110 115

ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG
 Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu
 120 125 130

CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT GTT GGA GAC AAA CTT CAC TGC CTC
 Leu Arg Gly Lys Asp Phe Trp Ile Val Gly Asp Lys Leu His Cys Leu
 135 140 145 150

AGC CAG AAC TAC TGG CTC TGG GCT TCT GAA GTG GCA GCA GGG ATT CAG
 Ser Gln Asn Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Glu Val Ala Ala Gly Ile Gln
 155 160 165

AGC CAA GAT TCC TGG TCT GCT GAA CCA AAC CTC CAG GTC CCT GGA CCA
 Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln Val Pro Gly Pro
 170 175 180

AAT CCC CGG ATA CCT GAA CAG GAT ACA CGA ACT CTT GAA TGG AAC TCG
 Asn Pro Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Leu Glu Trp Asn Ser
 185 190 195

TGG ACT CTT TCC TGG ACC CTC ACG CAG GAC CCT AGG AGC CCC GGA CAT
 Trp Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp Pro Arg Ser Pro Gly His
 200 205 210

TTC CTC AGG AAC ATC AGA CAC AGG CTC CCT GCC ACC CAA CCT CCA GCC
 Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro Ala Thr Gln Pro Pro Ala
 215 220 225 230

TGG ATA TTC TCC TTC CCC AAC CCA TCC TCC TAC TGG ACA GTA TAC GCT
 Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser Tyr Trp Thr Val Tyr Ala
 235 240 245

CTT CCC TCT TCC ACC CAC CTT GCC CAC CCC TGT GGT CCA GCT CCA CCC
 Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His Pro Cys Gly Pro Ala Pro Pro
 250 255 260

CCT GCT TCC TGACCCCTCT GCTCCAACGC CCACCCCTAC CAGCCCTCTT 931
 Pro Ala Ser
 265

CTAAACACAT CCTACACCCA CTCCDAGAAT CTGTCTCAGG AAGGGTAAGG TTCTCAGACA

CTGCCGACAT CAGCATTGTC TCSTGTACAG CTCCTTCCC TGCAGGGGCG
 CCTGGGAGA

CAACTGGACA AGATTTCTTA CTTTCTCCTG AAACCCAAAG CCTTGSTAAA AGGGATACAC

AGGACTGAAA AGGGAATCAT TTTTCACTGT ACATTATAAA CCTTCAGAAG CTA 1164

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO:29:

(I) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 265 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: белок

(XI) Описание последовательности SEQ ID NO:29;

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

Val Ala Ala Gly Ile Gln Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn
 165 170 175
 Leu Gln Val Pro Gly Pro Asn Pro Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg
 180 185 190
 Thr Leu Glu Trp Asn Ser Trp Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp
 195 200 205
 Pro Arg Ser Pro Gly His Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro
 210 215 220
 Ala Thr Gln Pro Pro Ala Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Trp Thr Val Tyr Ala Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His Pro
 245 250 255
 Cys Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ser
 260 265

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:30:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 24 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:30:

GAGCTCACTA GTGTGCGACCT GCAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:31:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 24 пары оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:31:

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:32:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 80 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:32:

СТСАТААТТТ ТТААААААТТ САТТТГАСАА АТГСТААААТ ТСТТГАТТАА 50
ТАТТСТСААТ ТГТГАГСГСТ САСААТТАТ 80

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:33:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 86 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:33:

СГАТАААТТГ ТГАГСГСТСА СААТТГАГАА ТАТТААТСАА ГААТТТТАГС 50
АТТГТСААА ТГААТТТТТТ АААААТТАТГ АГАСГТ 86

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:34:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 89 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

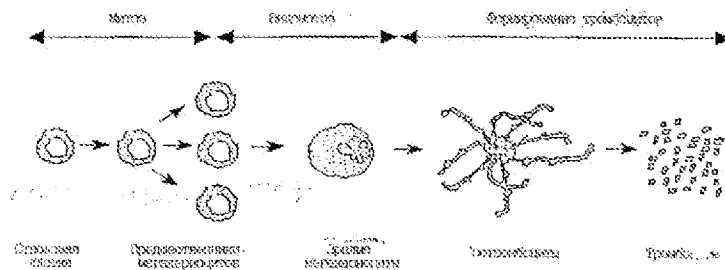
(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: кДНК

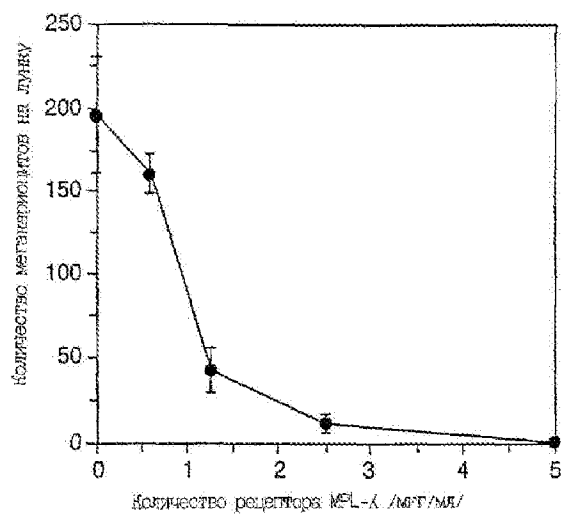
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:34:

ГАСГТСТСАТ ААТТТТТААА АААТТСАТТТ ГАСАААТГСТ ААААТТСТТГ 50
АТТАААТТТС ТСААТТГТГА ГСГСТСААА ТТТАТСГАТ 89

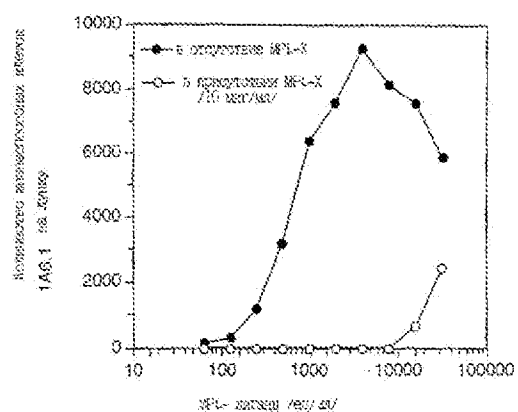
кДНК

Известие метаболизма и транскрипции





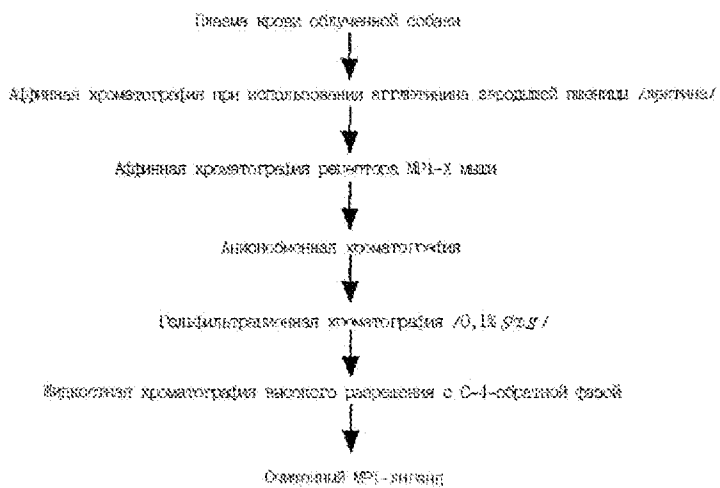
Фиг.2

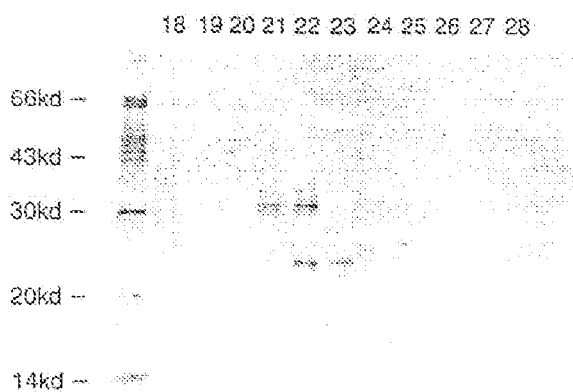
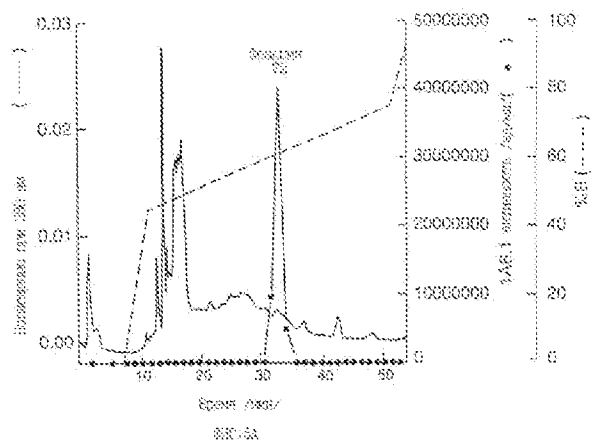


Фиг.3

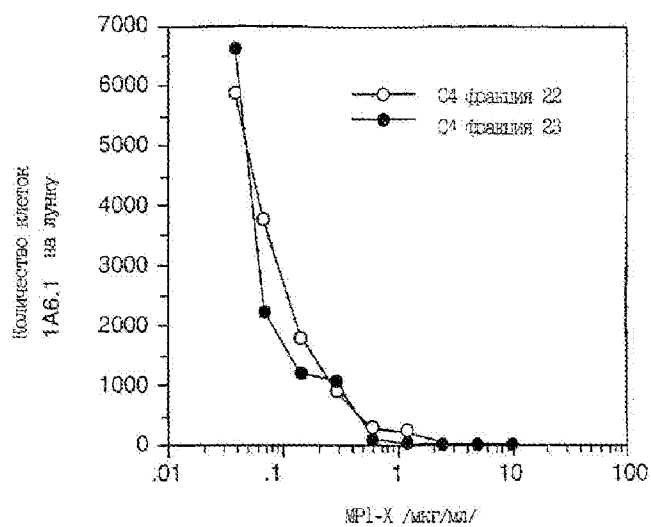
Фиг.4

СХЕМА МРЭ-ЛИНГЕНД





Электрофорез в 14%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS /неразрушающие условия/ Фиг. 6



Фиг. 7

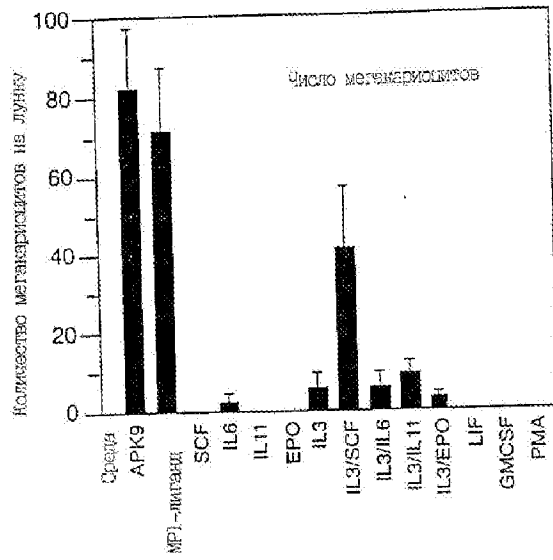


Рис. 7

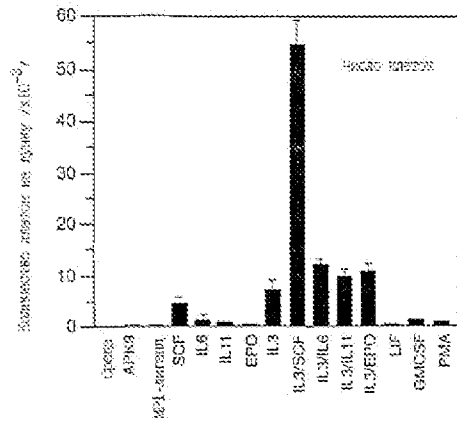


Рис. 8

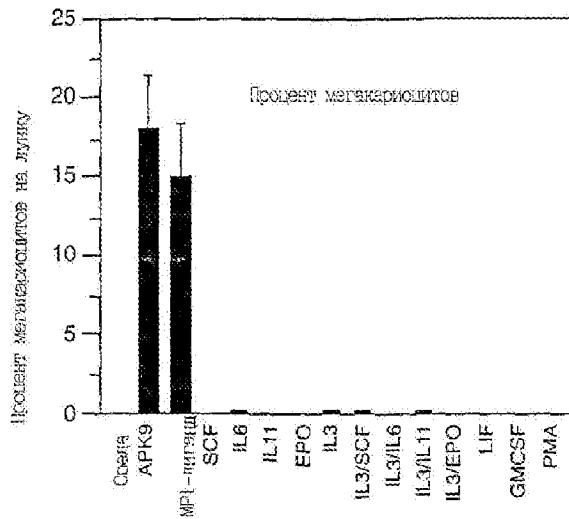
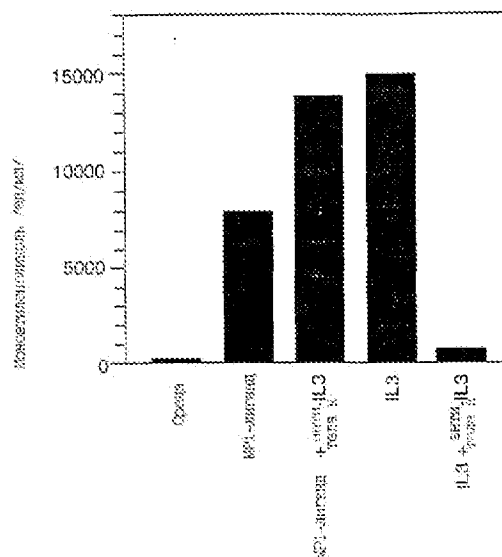


Рис. 9



517.13A

900	CAGCCTGGATATTCTCCTTCCCAACCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT	959
289	GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro	308
960	CTTCCACCCACCTTGGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCCTGACCCCTTCT	1019
309	LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer	328
1020	GCTCCAAAGCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAT	1079
329	AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn	348
1080	CTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACAG	1139
349	LeuSerGlnGluGlyEnd	353
1140	CTCCCTTCCCTGCAGGGGCGCCCTGGGAGACAACGGACAAGATTTCCTACTTTCTCCTG	1199
1200	AAACCCAAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTITTCACCTGT	1259
1260	ACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTTTAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT	1319
1320	AGCTCTTGGTCTATTTTCTGCA 1342	

SMF.11B

1	AGGAGGCCACGCCAGCAGACACCCCGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTG	60
	MetGluLeuThrGluLeuLeuVal	9
61	GTCATGCTTCTCCTAAGGCTAAGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGAC	120
10	ValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCysAsp	29
121	CTCCGAGTCTCAGTAAAGCTTCTGACTCCCATGTCCCTTCACACGAGACTCAGCCAG	180
30	LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGln	49
181	TGCCAGAGGTTTACCCCTTGGCTACAGCTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	240
50	CysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeu	69
241	GGAGAATGGAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCGGGAGCAGTGACC	300
70	GlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThr	89
301	CTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCAGGGGACAACGGGACCCACTTGCCTCTCATCC	360
90	LeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSer	109
361	CTCCTGGGGCAGCTTCTTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGGAGAGCCTCCTT	420
110	LeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu	129
421	GGAAACCCAGCTTCTCCACAGGGTAGGACCACAGCTTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTC	480
130	GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePhe	149
481	CTGAGCTTCCACACCTGCTCCGAGGAAGGACTTCTGCATTGTTGGAGACAACTTCAC	540
150	LeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysAspPheTrpIleValGlyAspLysLeuHis	169
541	TGCTTCAGCCAGAATACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGCATTGAGAGCCAA	600
170	CysLeuSerGlnAsnTyrTrpLeuTrpAlaSerGluValAlaAlaGlyIleGlnSerGln	189
601	GATTCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCCTGGACCAATCCCGGATACCTGAA	660
190	AspSerTrpSerAlaGluProAsnLeuGlnValProGlyProAsnProArgIleProGlu	209
661	CAGGATACAGAACTCTTGAATGGAATCCTGGACTCTTCTCTGGACCTCAGCAGGAC	720
210	GlnAspThrArgThrLeuGluTrpAsnSerTrpThrLeuSerTrpThrLeuThrGlnAsp	229
721	CCTAGGACCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCTGCCACCGAACCT	780
230	ProArgSerProGlyHisPheLeuArgAsnIleArgHisArgLeuProAlaThrGlnPro	249
781	CCAGCCTGATATTCTCCTTCCCAACCCCTCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCC	840
250	ProAlaTrpIlePheSerPheProAsnProSerSerTyrTrpThrValTyrAlaLeuPro	269

SMF.12A

841	TCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCTGACCTTC	900
270	SerSerThrHisLeuAlaHisProCysGlyProAlaProProProAlaSerEnd	286
981	TGCTCCAACGCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAA	960
961	TCTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACA	1020
1021	GCTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAAGATTCTCTACTTTCTCCT	1080
1081	GAAACCCAAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTCTACTG	1140
1141	TACATTATAACCTTCAGAAGCTA	1164

SMF.12B

CoGen	1	MELTELLLVVMLLLTARLDPLPAPPACDFRLNFMRLRDSHVLHSRLSQC	50
Herose	1	MELTELLLVVMLLLTARLTLSFPAPPACDLAVLSKLLRDSHVLHSRLSQC	50
51	PDIYPLSTPVLLPAVDFTSLGEWRTQKEQTKAQDVWQAVALLDGVLAARG	100	
51	PEVRHPLPTFVLLPAVDFTSLGEWRTQMEETKAQDILGAVTLLEGVMAARG	100	
101	QLGPTCLSSLLGQSLSCQVRLLLGALQSLGCTQLPPQGRITTHKDPNAIFL	150	
101	QLGPTCLSSLLGQSLSCQVRLLLGALQSLGCTQLPPQGRITAHKDPNAIFL	150	
151	SPQQLLRGKVRFLLLVAGPTLCAKQSQPTTAVPTNTSLFLTLAKLPNRTS	200	
151	SPQHLRLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTLMELPNRTS	200	
201	GLLETNSSISARTTISGLLKLQCFRAXIPGLLNQTSRLNQTGHLNRT	250	
201	GLLETNFTASARTTISGLLKWQCFRAXIPGLLNQTSRLDQIPGYLNRI	250	
251	HGPIINCTHGLLPGLSLTALGAPDIPPGTSEMDALPPNLWPRYSPSPHPP	300	
251	HELLNCTHGLFPGPSRRLGAPDISGCTSDTGSLPFNLQPGYSPSPHPP	300	
301	PGQYTLFSPLPTSPFPQNPLQPPFPDFSA.TANSTSPLLIAAHHPQNLS	349	
301	TGQYTLFPLPPLPTPVVQLHPLLRDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLS	350	
350	QEE	352	
351	QEG	353	

SMF.13A


```

1 MELTQGLLAAMLLAVARLTLSPPVAFACDFRLNVLRLRSHLLHSRLSQ 50
|||||
Genbank1 MELTQGLLVVMLLTARLTLSPPAPPACDLRLVSLRLRDSHVLHSRLSQ 50
|||||
51 FUVDPISIPVLLFANDFSLGENKTTQTSKAQDILGAVSLLEGVMAARG 100
|||||
51 FGVHPLPTPVLLFANDFSLGENKTMKEETKAQDILGAVSLLEGVMAARG 100
|||||
151 QLEPSCLSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTOLPLQGRTTAKKDPNALFL 150
|||||
151 QLGFTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTOLPLQGRTTAKKDPNALFL 150
|||||
151 SLQQLLRGVVPILLVEGPTLQVARTLPTTAVPSSTSQLATLNRFPNRTS 200
|||||
151 SFQSLLAGNVKXALNCGSTLCVRRAPPTTAVPERTSLVLTNLNLPNRTS 200
|||||
201 GLLETNFSEVARTACFGLLSRLQGFPRVKITPGQINQTSRSFVQISGYLNF 250
|||||
201 GLLETNFSEVARTTGSGLLNKQGFPRVKITPGQINQTSRSFVQISGYLNF 250
|||||
251 TRGPVNGTHGLFACTSLQLEASDISPGAFNKGSLAFNLOOGLPPEPSLA 300
|||||
251 IMELLANTHGLFQGSRRKLGAPDISGTHDYSLEFNLQPGYSPSTHPS 300
|||||
301 FGDH,TFPPFSPALPTTHGSRPQLKPLFPDPSSTMFNSTAPHFVTHYKPS 345
|||||
300 PTGQYTLFPLPFTLPT...FVVQLAFLLFDFSAFTPTPTSPLINTSYTHS 346
|||||
350 RNLSGET 355
|||||
347 QNLGCEG 351

```

Fig. 135

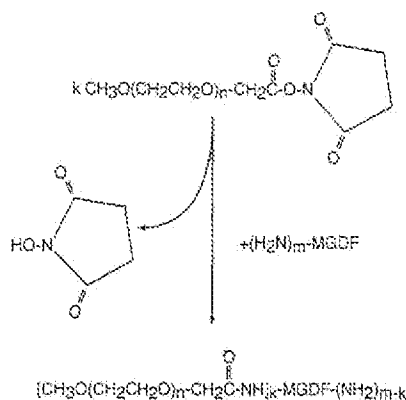
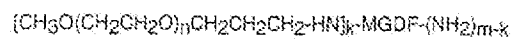
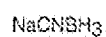
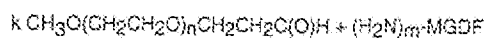


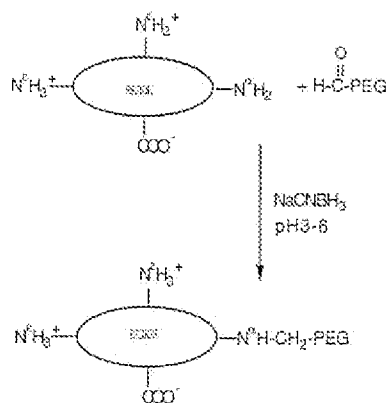
Fig. 136

Fig. 134



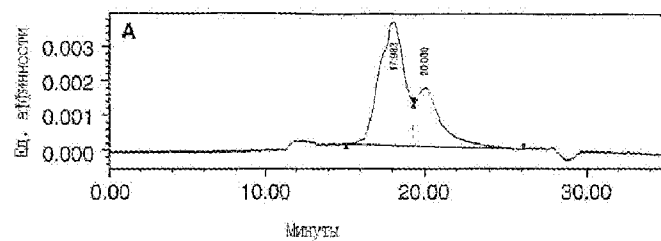
- k - Количество молекул ПЭГ, реагирующей с молекулой MGDF
- n - Степень полимеризации ПЭГ, используемого в реакции, например, $n=2000$ для ПЭГ молекулярной массой 4000, $n=40$ для ПЭГ молекулярной 2 kD
- m - Общее число первичных аммингрупп на молекулу

Фиг.15

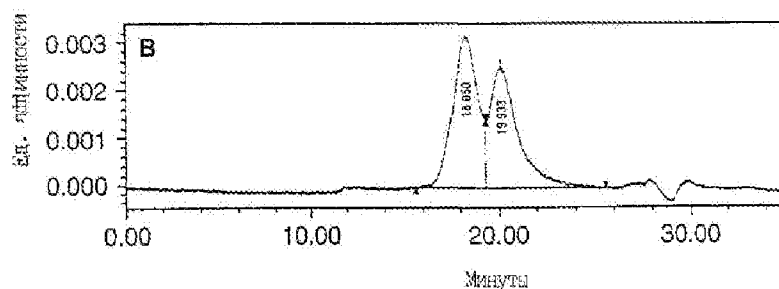


Фиг.16

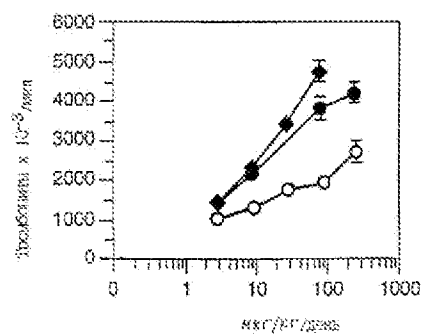
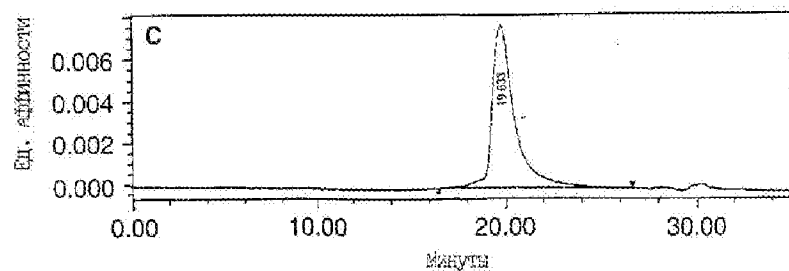
Фиг.17А



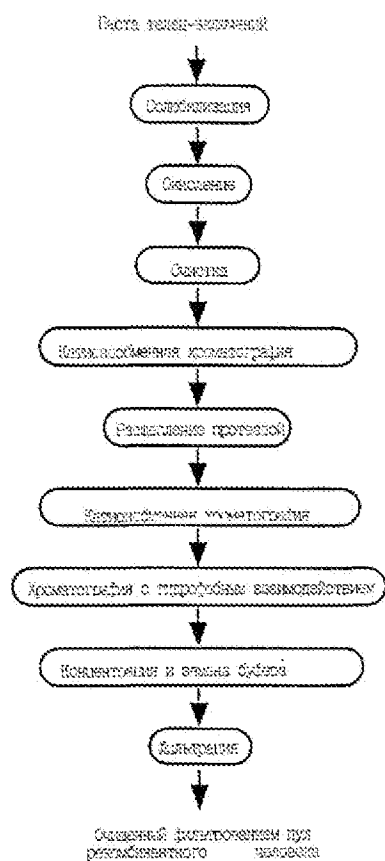
Фиг.17Б



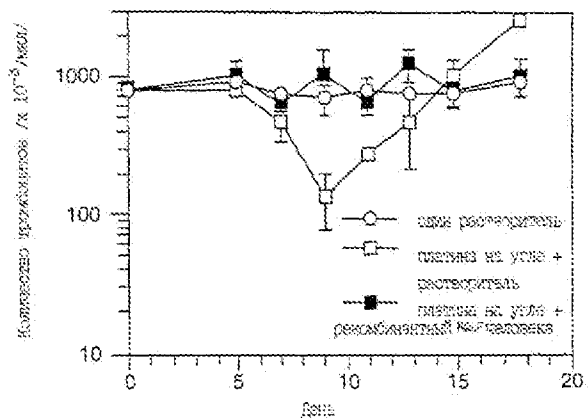
ФИГ. 17Б



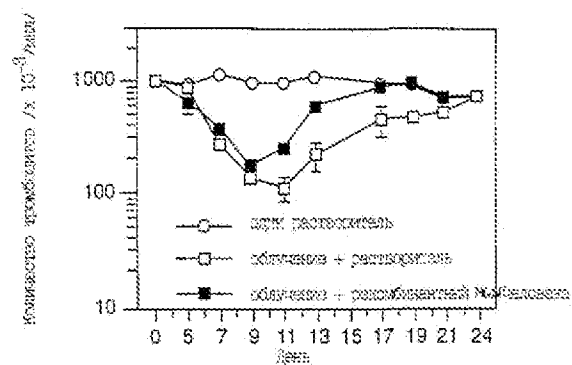
ФИГ. 18



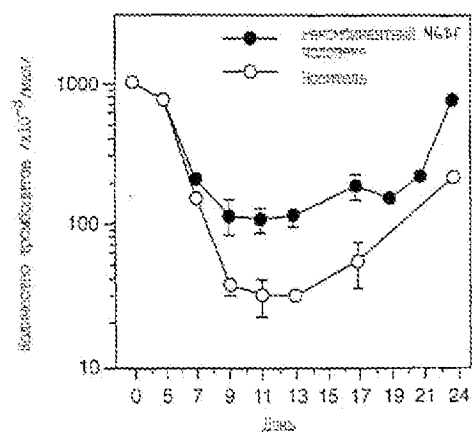
ФИГ. 19



20



21



22

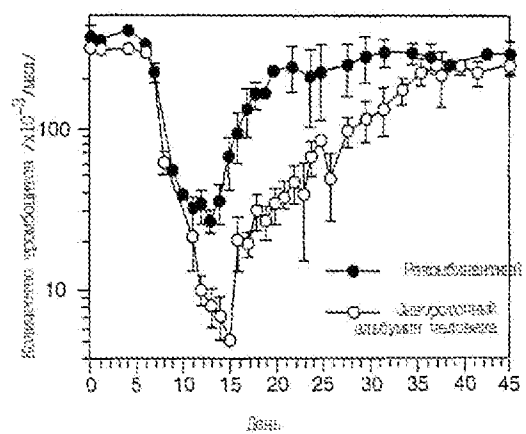
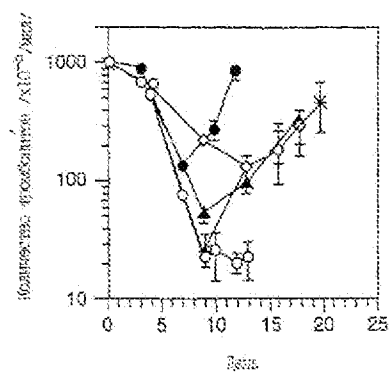


рис. 23



- coli 1-163 (12kd dipeg) (PEG 22)
- CHO 1-332
- ▲ coli 1-163 (25kd monopeg) (PEG 17)
- ✱ coli 1-163 (20kd monopeg) (PEG 16)
- ctl

рис. 24

ATG AAA AGT CCT GCA CCA CCT GCA TGT GAT TTA CGG GTC CTG
 MET LYS SER PRO ALA PRO PRO ALA CYS ASP LEU ARG VAL LEU

 TCT AAA CTG CTG CGC GAC TCT CAC GTG CTG CAC TCT CGT CTG
 SER LYS LEU LEU ARG ASP SER HIS VAL LEU HIS SER ARG LEU

 TCC CAG TGC CCG GAA GTT CAC CCG CTG CCG ACC CCG GTT CTG
 SER GLN CYS PRO GLU VAL HIS PRO LEU PRO THR PRO VAL LEU

 CTT CCG GCT GTC GAC TTC TCC CTG GGT GAA TGG AAA ACC CAG
 LEU PRO ALA VAL ASP PHE SER LEU GLY GLU TRP LYS THR GLN

 ATG GAA GAG ACC AAA GCT CAG GAC ATC CTG GGT GCA GTA ACT
 MET GLU GLU THR LYS ALA GLN ASP ILE LEU GLY ALA VAL THR

 CTG CTT CTG GAA GGC GTT ATG GCT GCA CGT GGC CAG CTT GGC
 LEU LEU LEU GLU GLY VAL MET ALA ALA ARG GLY GLN LEU GLY

 CCG ACC TGC CTG TCT TCC CTG CTT GGC CAG CTG TCT GGC CAG
 PRO THR CYS LEU SER SER LEU LEU GLY GLN LEU SER GLY GLN

 GTT CGT CTG CTG CTG GGC GCT CTG CAG TCT CTG CTT GGC ACC
 VAL ARG LEU LEU LEU GLY ALA LEU GLN SER LEU LEU GLY THR

 CAG CTG CCG CCA CAG GGC CGT ACC ACT GCT CAC AAG GAT CCG
 GLN LEU PRO PRO GLN GLY ARG THR THR ALA HIS LYS ASP PRO

 AAC GCT ATC TTC CTG TCT TTC CAG CAC CTG CTG CGT GGC AAA
 ASN ALA ILE PHE LEU SER PHE GLN HIS LEU LEU ARG GLY LYS

 GTT CGT TTC CTG ATG CTG GTT GGC GGT TCT ACC CTG TGC GTT
 VAL ARG PHE LEU MET LEU VAL GLY GLY SER THR LEU CYS VAL

 CGT CCG GCG CCG CCA ACC ACT GCT GTT CCG TCT TAA
 ARG ARG ALA PRO PRO THR THR ALA VAL PRO SER STOP