



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326903**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19962783	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.12.28 PCT/US94/14553
(22)	Inng.dag	1996.07.02	(85)	Videreføringsdag	1996.07.02
(24)	Løpedag	1994.12.28	(30)	Prioritet	1994.01.03, US, 176553 1994.01.21, US, 185607 1994.02.15, US, 196689 1994.04.04, US, 223263 1994.05.25, US, 249376 1994.12.02, US, 348657 1994.12.02, US, 348658
(41)	Alm.tilgj	1996.09.03			
(45)	Meddelt	2009.03.16			
(83)	Biol.mat. dep	Ukjent			
(73)	Innehaver	Genentech Inc, 1 DNA Way, CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, US			
(72)	Oppfinner	Dan L. Eaton, San Rafael, CA, US Frederic J. de Sauvage, Foster City, CA, US			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Isolert mpl-ligandpolypeptid, isolert nukleinsyremolekyl, ekspresjonsvektor, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av mpl-ligand, antistoff og farmasøytisk preparat for behandling eller forebyggelse av trombocytopeni.		
(56)	Anførte publikasjoner	Exp. Hematology, vol. 17, 1989, side 865-871 av McDonald et al. NO954058* (WO 9521919)		
(57)	Sammendrag			

Isolert trombopoietin (TPO), isolert DNA som koder for TPO, og rekombinante eller syntetiske fremgangsmåter for fremstilling og rensing av TPO, er beskrevet. Forskjellige former av TPO er vist å virke inn på replikasjonen, differensieringen eller modningen av blodceller, spesielt megakaryocytter og megakaryocytforløperceller. Følgelig kan disse forbindelsene anvendes til behandling av trombocytopeni.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse omfatter isolert *mpl*-ligandpolypeptid, isolert nukleinsyremolekyl, ekspresjonsvektor, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av *mpl*-ligand, antistoff og farmasøytisk preparat for behandling eller forebygging av trombocytopeni.

Oppfinnelsens bakgrunn

I. Hematopoesesystemet

Hematopoesesystemet produserer de modne, høyt spesialiserte blodceller som er kjent for å være nødvendige for alle pattedyrs overlevelse. Disse modne cellene omfatter: erytrocytter, spesialisert til å transportere oksygen og karbondioksid, T- og B-lymfocytter, som er ansvarlige for celle- og antistoff-formidlede immunresponser, blodplater eller trombocytter, spesialisert til å danne blodlevringer, og granulocytter og makrofager, spesialisert som utrenskningsmidler og som supplerende celler for bekjempelse av infeksjon. Granulocytter er videre oppdelt i: nøytrofiler, eosinofiler, basofiler og mastceller, spesialiserte celletyper med atskilte funksjoner. Det er verdt å legge merke til at alle disse spesialiserte, modne blodcellene er avledet fra en enkelt, felles, primitiv celletype, henvist til som den flerpotente (eller totipotente) stamcelle, som finnes hovedsakelig i benmarg (Dexter et al., Ann. Rev. Cell Biol., 3:423-441 (1987)).

De modne, høyt spesialiserte blodcellene må produseres i store antall kontinuerlig gjennom et pattedyrs liv. De aller fleste av disse spesialiserte blodcellene er bestemt til å forbli funksjonelt aktive i bare noen få timer til uker (Conkrite et al., Blood Cells, 2:263-284 (1976)). Kontinuerlig fornyelse av de modne blodcellene, selve de primitive stamcellene samt alle mellomliggende eller linjeengasjerte forløpercellelinjer som ligger mellom de primitive og modne celler, er således nødvendig for å opprettholde pattedyrets normale behov for en blodcellelikevekt.

I hjertet av hematopoesesystemet ligger den eller de flerpotente stamcelle(r). Disse cellene er forholdsvis få i antall og gjennomgår selvfornyelse ved proliferasjon slik at

de produserer datterstamceller eller omdannes i en serie av differensieringstrinn til stadig mer modne linjebegrensede forløperceller som til sist danner den eller de høyt spesialiserte, modne blodcelle(r).

5 For eksempel gjennomgår visse flerpotente forløperceller, henvist til som CFC-blanding, som er avledet fra stamceller, proliferasjon (selvfornyelse) og utvikling til å produsere kolonier som inneholder alle de forskjellige myeloidcellene; erytrocytter, nøytrofiler, megakaryocytt (forløpere
10 til blodplater), makrofager, basofiler, eosinofiler og mastceller. Andre forløperceller til lymfoidlinjen gjennomgår proliferasjon og utvikling til T-celler og B-celler.

I tillegg ligger det, mellom CFC-blandingsforløpercellene og myeloidcellene, en annen rekke av forløperceller
15 med mellomliggende engasjement til sitt avkom. Disse linjebegrensede forløperceller er klassifisert på grunnlag av avkommet som de produserer. De kjente, umiddelbare forløpere til myeloidcellene er således: erytroidkolonidannende enheter (CFU-E) for erytrocytter, granulocyt/makrofag-kolonidannende
20 celler (GM-CFC) for nøytrofiler og makrofager, megakaryocyttkolonidannende celler (Meg-CFC) for megakaryocytt, eosinofilkolonidannende celler (Eos-CFC) for eosinofiler, og basofilkolonidannende celler (Bas-CFC) for mastceller. Andre mellomliggende forgjengerceller mellom de flerpotente stamceller
25 og de modne blodceller er kjent (se nedenunder), eller vil sannsynligvis bli oppdaget, og har varierende grader av linjebegrensning og selvfornylseskapasitet.

Det underliggende prinsipp for det normale hematopoiesecellesystem synes å være redusert kapasitet for selvfornyelse etter hvert som flerpotens går tapt og linjebegrensning
30 og modenhet erverves. I den ene enden av hematopoiesecellespektret ligger således den flerpotente stamcelle som har kapasitet til selvfornyelse og differensiering til alle de forskjellige linjespesifikt engasjerte forløperceller. Denne
35 kapasiteten er grunnlaget for benmargstransplantasjonsterapi når primitive stamceller på nytt inntar hele hematopoiesecellesystemet. I den andre enden av spektret ligger de høyt linjebegrensede forløperne og deres avkom som har tapt evnen

til selvfornyelse; men har ervervet moden, funksjonell aktivitet.

Proliferasjonen og utviklingen av stamceller og linjebegrensede forløperceller reguleres nøye av mange forskjellige hematopoesevekstfaktorer eller cytokiner. Rollen til disse vekstfaktorene *in vivo* er kompleks og ufullstendig forstått. Noen vekstfaktorer, slik som interleukin-3 (IL-3), er i stand til å stimulere både flerpotente stamceller så vel som engasjere forløperceller i flere linjer, inkludert f.eks. megakaryocytter. Andre faktorer, slik som granulocyt/makrofag-kolonistimulerende faktor (GM-CSF), ble først antatt å være begrenset i sin virkning til GM-CSF-er. Senere ble det imidlertid oppdaget at GM-CSF også virket inn på proliferasjonen og utviklingen av blant annet megakaryocytter. IL-3 og GM-CSF ble således funnet å ha overlappende biologiske aktiviteter, riktignok med forskjellig styrke. Nylig er det funnet at både interleukin-6 (IL-6) og interleukin-11 (IL-11), selv om de ikke har noen åpenbar påvirkning på megakolonidannelse alene, virker synergistisk med IL-3 til å stimulere modning av megakaryocytter (Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, 20:1011-1016 (1992)).

Hematopoesevekstfaktorer kan således påvirke vekst og differensiering av én eller flere linjer, kan overlappe med andre vekstfaktorer for påvirkning av en enkelt forløpercellelinje, eller kan virke synergistisk med andre faktorer.

Det synes også som om hematopoesevekstfaktorer kan utøve sin effekt på forskjellige stadier av celleutvikling, fra den totipotente stamcelle gjennom forskjellige engasjerte, linjebegrensede forløpere til den modne blodcelle. For eksempel synes erythropoietin (epo) å fremme proliferasjon bare av modne erytroidforløperceller. IL-3 synes å utøve denne effekten tidligere, idet den påvirker primitive stamceller og mellomliggende, linjebegrensede forløperceller. Andre vekstfaktorer, slik som stamcellefaktor (SCF), kan påvirke selv mer primitiv celleutvikling.

Det vil forstås fra det ovenfor nevnte at nye hematopoesevekstfaktorer som påvirker overlevelse, proliferasjon, differensiering eller modning av hvilken som helst av blodcel-

lene eller avkommene derav, ville være nyttige, spesielt til å hjelpe til ved gjenopprettelsen av et redusert hematopoesesystem forårsaket av sykdom eller etter stråle- eller kjemoterapi.

II. Megakaryocytopoese. Blodplateproduksjon

Regulering av megakaryocytopoese og blodcelleproduksjon er det gitt en oversikt over av: Mazur, Exp. Hematol., 15:248 (1987) og Hoffman, Blood, 74:1196-1212 (1989). I korte trekk differensierer flerpotente benmargsstamceller til megakaryocyt-, erytrocytt- og myelocytceller. Det menes at det er et hierarki av engasjerte megakaryocytforløperceller mellom stamceller og megakaryocytter. Det er blitt identifisert minst tre klasser av megakaryocytforløperceller, nemlig: forsterkningsdannende enhetsmegakaryocytter (BFU-MK), kolonidannende enhetsmegakaryocytter (CFU-MK) og megakaryocytforløperceller med lav tetthet (LD-CFU-MK). Megakaryocytmodning er i seg selv en kontinuerlig utvikling som er blitt oppdelt i stadier basert på standard morfologiske kriterier. Det tidligst gjenkjennelige medlem av megakaryocytfamilien (MK eller meg) er megakaryoblastene. Disse cellene er til å begynne med 20-30 µm i diameter og har basofilcytoplasma og en svakt irregulær kjerne med løst, noe retikulært kromatin og flere kjerner. Senere kan megakaryoblaster inneholde opptil 32 kjerner (polyploid), men cytoplasmaet forblir sparsomt og umodent. Etter hvert som modningen skrider frem, blir kjernen mer flikformet og pyknotisk, cytoplasmaet øker i mengde og blir mer acidofilt og granulært. De fleste modne celler i denne familien kan synes å avgi blodplater i sin periferi. Normalt er mindre enn 10% av megakaryocytene i blaststadiet, og mer enn 50% er modne. Vilkårslige, morfologiske klassifikasjoner som vanligvis er anvendt til megakaryocytserien, er megakaryoblast for den tidligste form, promegakaryocyt eller basofil megakaryocyt for den mellomliggende form og moden (acidofil, granulær eller blodplateproduserende) megakaryocyt for de seneste formene. Den modne megakaryocyt sender ut filamenter av cytoplasmaet i sinusoidale rom hvor de løsner og fragmenterer til individuelle blodplater (Williams et al.,

Hematology, 1972).

Megakaryocytopoese menes å involvere flere regulatorfaktorer (Williams et al., Br. J. Haematol., 52:173 (1982) og Williams et al., J. Cell Physiol., 110:101 (1982)). Det tidlige nivå av megakaryocytopoese er postulert til å være mitotisk, beskjeftiget med celleproliferasjon og koloniinitiering fra CFU-MK, men påvirkes ikke av blodplateantall (Burstein et al., J. Cell Physiol., 109:333 (1981) og Kimura et al., Exp. Hematol., 13:1048 (1985)). Det senere stadium av modning er ikke-mitotisk, beskjeftiget med kjernepolyploidisering og cytoplasmisk modning og reguleres sannsynligvis ved en feed-back-mekanisme ved hjelp av antall perifere blodplater (Odell et al., Blood, 48:765 (1976) og Ebbe et al., Blood, 32:787 (1968)).

Eksistensen av en distinkt og spesifikk megakaryocyttkolonistimulerende faktor (MK-CSF) er blitt diskutert (Mazur, Exp. Hematol., 15:340-350 (1987)). De fleste forfatterne tror imidlertid at en prosess som er så vital for overlevelse som blodplateproduksjon, ville være regulert av cytokin(er) som er utelukkende ansvarlig for denne prosessen. Hypotesen at megakaryocyt/blodplatespesifikt eller -spesifikke cytokin(er) eksisterer, har dannet grunnlag for mer enn 30 års leting, men hittil er det ikke blitt renset, sekvensert og etablert noe slikt cytokin ved hjelp av analyse som en unik MK-CSF (TPO).

Selv om det er blitt rapportert at MK-CSF-er er blitt delvis renset fra eksperimentelt fremstilt trombocytopeni (Hill et al., Exp. Hematol., 14:752 (1986)) og humanembryonyrekondisjonert medium (CM) (McDonald et al., J. Lab. Clin. Med., 85:59 (1975)) og hos mennesker fra en plastisk anemi og idiopatiske, trombocytopeniske purpuraurinektstrakter (Kawakita et al., Blood, 6:556 (1983)) og plasma (Hoffman et al., J. Clin. Invest., 75:1174 (1985)), er deres fysiologiske funksjon fortsatt ukjent i de fleste tilfeller.

Det kondisjonerte medium med kermesbærmitogenaktiverende miltceller (PWM-SpCM) og den murine myelomonocyttcellelinje WEHI-3 (WEHI-3CM) er blitt brukt som megakaryocyttpotensiatorer. PWM-SpCM inneholder faktorer som fremmer CFU-MK-

vekst (Metcalf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72:1744-1748 (1975); Quesenberry et al., *Blood*, 65:214 (1985); og Iscove, N.N., i *Hematopoietic Cell Differentiation*, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, vol. 10, Golde et al., red. (New York, Academy Press), s. 37-52 (1978)), hvorav 5 én er interleukin-3 (IL-3), en flerlinjekolonistimulerende faktor (multi-CSF, Burstein, *Blood Cells*, 11:469 (1986)). De øvrige faktorene i dette mediet er ennå ikke blitt identifisert og isolert. WEHI-3 er en murin, myelomonocytisk cellelinje 10 som utskiller forholdsvis store mengder av IL-3 og mindre mengder av GM-CSF. IL-3 er blitt funnet å potensere veksten av et bredt spekter av hematopoeseceller (Ihle et al., *J. Immunol.*, 13:282 (1983)). IL-3 er også blitt funnet å gi synergi med mange av de kjente hematopoesehormonene eller 15 vekstfaktorene (Bartelmez et al., *J. Cell Physiol.*, 122:362-369 (1985) og Warren et al., *Cell*, 46:667-674 (1988)), inkludert både erythropoietin (EPO) og interleukin-1 (IL-1), ved induksjonen av svært tidlige, flerpotente forløpere og dannelsen av svært store, blandede hematopoesekolonier.

20 Andre kilder for megakaryocyttpotensiaterer er blitt funnet i de kondisjonerte medier av murine lunge-, ben-, makrofagcellelinjer, peritonealeksudatceller og humanembryonnyreceller. Til tross for visse motstridende data (Mazur, *Exp. Hematol.*, 15:340-350 (1987)) er det et visst bevismateriale 25 (Geissler et al., *Br. J. Haematol.*, 60:233-238 (1985)) for at aktiverte T-lymfocytter, og ikke monocytter, spiller en fremmende rolle ved megakaryocytopoese. Disse funnene tyder på at aktiverte T-lymfocyttssekresjoner, slik som interleukiner, kan være regulatorfaktorer ved MK-utvikling (Geissler et al., *Exp. Hematol.*, 15:845-853 (1987)). En rekke studier vedrørende 30 megakaryocytopoese med rensert erythropoietin EPO (Vainchenker et al., *Blood*, 54:940 (1979); McLeod et al., *Nature*, 261:492-4 (1976); og Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 (1984)) indikerer at dette hormonet har en fremmende effekt på MK-kolonidannelse. Dette er også blitt demonstrert i både serumfrie 35 og serumholdige kulturer, og ved fravær av supplerende celler (Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 (1984)). EPO ble postulert å være involvert mer i enkelt- og tocellestadiumaspek-

tene av megakaryocytopoese, i motsetning til effekten av PWM-SpCM som var involvert i firecellestadiet av megakaryocytutvikling. Interaksjonen av alle disse faktorene på både tidlig og sen fase av megakaryocytutvikling gjenstår å bli belyst.

5 Data frembrakt fra flere laboratorier, tyder på at de eneste flerlinjefaktorene som individuelt har MK-kolonistimulerende aktivitet, er GM-CSF og IL-3, og i et mindre omfang, den B-cellestimulerende faktor IL-6 (Ikebuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:9035 (1987)). I den senere tid har
10 flere forfattere rapportert at IL-11 og leukemiinhibitorfaktor (LIF) virker synergistisk med IL-3 slik at megakaryocytstørrelse og ploiditet øker (Yonemura et al., British Journal of Hematology, 84:16-23 (1993); Burstein et al., J. Cell. Physiol., 153:305-312 (1992); Metcalf et al., Blood, 76:50-56
15 (1990); Metcalf et al., Blood, 77:2150-2153 (1991); Bruno et al., Exp. Hematol., 19:378-381 (1991); og Yonemura et al., Exp. Hematol., 20:1011-1016 (1992)).

Andre dokumenter av interesse omfatter: Eppstein et al., US patentskrift nr. 4 962 091; Chong, US patentskrift nr.
20 4 879 111; Fernandes et al., US patentskrift nr. 4 604 377; Wissler et al., US patentskrift nr. 4 512 971; Gottlieb, US patentskrift nr. 4 468 379; Bennett et al., US patentskrift nr. 5 215 895; Kogan et al., US patentskrift nr. 5 250 732; Kimura et al., Eur. J. Immunol., 20(9):1927-1931 (1990); Secor
25 et al., J. of Immunol., 144(4):1484-1489 (1990); Warren et al., J. of Immunol., 140(1):94-99 (1988); Warren et al., Exp. Hematol., 17(11):1095-1099 (1989); Bruno et al., Exp. Hematol., 17(10):1038-1043 (1989); Tanikawa et al., Exp. Hematol., 17(8):883-888 (1989); Koike et al., Blood, 75(12):2286-2291
30 (1990); Lotem, Blood, 75(5):1545-1551 (1989); Rennick et al., Blood, 73(7):1828-1835 (1989); og Clutterbuck et al., Blood, 73(6):1504-1512 (1989).

III. Trombocytopeni

35 Blodplater er avgjørende elementer i blodlevringsmekanismen. Utarming av nivået av blodplater i blodomløpet, kalt trombocytopeni, opptrer under forskjellige kliniske tilstander og forstyrrelser. Trombocytopeni defineres vanligvis

som et blodplateantall som er under 150×10^9 pr. liter. Hovedårsakene til trombocytopeni kan generelt deles i tre kategorier på grunnlag av levetiden til blodplatene, nemlig: (1) forstyrrelse av benmargens produksjon av blodplater, (2) blodplatesekvestrering i milten (splenomegali) eller (3) forøkt ødeleggelse av blodplater i det perifere blodomløp (f.eks. autoimmuntrombocytopeni eller kjemo- og stråleterapi). I tillegg vil trombocytopeni kunne utvikles på grunn av fortynning hos pasienter som får store volumer med hurtig administrerte, blodplatefattige blodprodukter.

De kliniske blødningsmanifestasjoner av trombocytopeni avhenger av trombocytopeniens alvorlighet, dens årsak og mulige ledsagende koagulasjonsdefekter. Generelt har pasienter med blodplateantall mellom 20 og 100×10^9 pr. liter en risiko for stor posttraumatisk blødning, mens de som har blodplateantall under 20×10^9 pr. liter, kan blø spontant. Disse sistnevnte pasientene er kandidater for blodplatetransfusjon med ledsagende immun- og virusrisiko. For enhver bestemt grad av trombocytopeni er blødning tilbøyelig til å være mer alvorlig når årsaken er redusert produksjon, og ikke forøkt ødeleggelse av blodplater. I den sistnevnte situasjon resulterer forøkt blodplateomsetning i omløpet av yngre, større og hemostatisk mer effektive blodplater. Trombocytopeni kan skrive seg fra mange forskjellige forstyrrelser som i korte trekk er beskrevet nedenunder. En nærmere beskrivelse kan finnes i Schaffner, A.I., "Thrombocytopenia and Disorders of Platelet Function", Internal Medicine, 3. utg., John J. Hutton et al., red., Little Brown and Co., Boston/Toronto/London (1990).

(a) Trombocytopeni som skyldes forstyrret blodplateproduksjon

Årsaker til kongenital trombocytopeni omfatter konstitusjonell, aplastisk anemi (Fanconi-syndrom) og kongenital, amegakaryocytisk trombocytopeni, som kan være forbundet med skjelettmisdannelser. Ervervede forstyrrelser av blodplateproduksjon forårsakes av enten hypoplasi av megakaryocytter eller ineffektiv trombopoese. Megakaryocytisk hypoplasi kan skrive seg fra mange forskjellige tilstander, inkludert mar- gaplasi (inkludert idiopatiske former eller myelosuppresjon

ved hjelp av kjemoterapeutiske midler eller stråleterapi), myelfibrose, leukemi og invasjon av benmargen av metastatisk tumor eller granulomer. I noen situasjoner vil toksiner, infeksionse agenser eller legemidler virke inn på trombopoese

5 forholdsvis selektivt; eksempler omfatter forbigående trombocytopenier forårsaket av alkohol og visse virusinfeksjoner, og mild trombocytopeni forbundet med administreringen av tiazid-diuretika. Endelig kan ineffektiv trombopoese som er sekundær til megaloblaste prosesser (folat- eller B₁₂-mangel), også for-

10 årsake trombocytopeni, vanligvis med samtidig anemi og leukopeni.

Nåværende behandling av trombocytopenier som skyldes redusert blodplateproduksjon, avhenger av identifikasjon og reversering av den underliggende årsak til benmargssvikten.

15 Blodplatetransfusjoner er vanligvis reservert for pasienter med alvorlige blødningskomplikasjoner, eller for dekning under kirurgiske inngrep, ettersom isoimmunisering kan føre til gjenstridighet mot ytterligere blodplatetransfusjoner. Slimhinneblødning som skriver seg fra alvorlig trombocytopeni, kan

20 lindres ved hjelp av oral eller intravenøs administrering av de antifibrinolytiske midler. Trombosekomplikasjoner kan imidlertid utvikles dersom det anvendes antifibrinolytiske midler på pasienter med disseminert, intravaskulær koagulasjon (DIC).

(b) Trombocytopeni som skyldes splenisk sekvestrering

25 Splenomegali på grunn av hvilken som helst årsak kan være forbundet med mild til moderat trombocytopeni. Dette er en stort sett passiv prosess (hypersplenisme) med splenisk blodplatesekvestrering, i motsetning til den aktive ødeleggelse av blodplater ved hjelp av milten i tilfeller med immuno-

30 mediert trombocytopeni omtalt nedenunder. Selv om den vanligste årsak til hypersplenisme er kongestiv splenomegali fra portal hypertensjon på grunn av alkoholcirrhose, er også andre former av kongestiv, infiltrativ eller lymfoproliferativ splenomegali forbundet med trombocytopeni. Blodplateantall

35 faller generelt ikke under 50×10^9 pr. liter som et resultat av hypersplenisme alene.

(c) Trombocytopeni som skyldes ikke-immunmediert blodplateødeleggelse

Trombocytopeni kan skrive seg fra den akselererte ødeleggelse av blodplater ved hjelp av forskjellige ikke-immunologiske prosesser. Forstyrrelser av denne type omfatter disseminert, intravaskulær koagulasjon, intravaskulære proteseanordninger, utenomkroppslig blodomløp og trombotiske mikroangiopatier, slik som trombotisk trombocyttopurpura. Ved alle disse situasjoner konsumeres blodplater i omløp som eksponeres mot enten kunstige anordninger eller unormale, vaskulære, indre belegg, enten på disse stedene eller ødelegges og så fjernes altfor tidlig av retikuloendotelsystemet. Sykdomstilstander eller forstyrrelser hvor disseminert, intravaskulær koagulasjon (DIC) kan oppstå, er nærmere omtalt i Braunwald et al. (red.), Harrison's Principles of Internal Medicine, 11. utg., s. 1478, McGraw Hill (1987). Intravaskulære proteseanordninger, inkludert hjerteventiler og ballonger i aorta, kan forårsake en mild til moderat destruktiv trombocytopeni og forbigående trombocytopeni hos pasienter som gjennomgår kardiopulmonal bypass, eller hemodialyse kan resultere fra forbruk eller skade av blodplater i det utenomkroppslige omløp.

20 (d) Legemiddelindusert immuntrombocytopeni

Mer enn 100 legemidler har vært implisert i immunologisk formidlet trombocytopeni. Bare kinidin, kinin, gull, sulfonamider, cefalotin og heparin er imidlertid hittil blitt godt karakterisert. Legemiddelindusert trombocytopeni er ofte svært alvorlig og inntreffer vanligvis i kraftig økende grad i løpet av dager mens pasientene tar den sensitiviserende medisiner.

(e) Immun (autoimmun), trombocytopenisk purpura (ITP)

ITP hos voksne er en kronisk sykdom som er kjennetegnet ved autoimmunblodplateødeleggelse. Autoantistoffet er vanligvis IgG, selv om andre immunglobuliner også er blitt rapportert. Selv om autoantistoffet til ITP er blitt funnet å være forbundet med blodplatemembran GPIIb/IIIa, er blodplateantigenspesifisiteten ikke blitt identifisert i de fleste tilfeller. Ekstravaskulær ødeleggelse av sensitiviserede blodplater inntreffer i retikuloendotelsystemet i milten og leveren. Selv om over halvparten av alle tilfellene av ITP er idiopatiske, har mange pasienter underliggende reumatiske eller auto-

immunsykdommer (f.eks. systemisk lupus erythematosus) eller lymfoproliferative sykdommer (f.eks. kronisk lymfocytteleukemi).

(f) HIV-indusert ITP

5 ITP er en økende vanlig komplikasjon ved HIV-infeksjon (Morris et al., Ann. Intern. Med., 96:714-717 (1982)) og kan opptre på et hvilket som helst stadium av sykdomsforløpet, både hos pasienter diagnostisert med ervervet immunsviktsyndrom (AIDS), hos de som har AIDS-relatert kompleks, og de med
10 HIV-infeksjon, men uten AIDS-symptomer. HIV-infeksjon er en overførbart sykdom som til sist er kjennetegnet ved en uttalt mangel på cellulær immunfunksjon samt fremkomsten av en opportunistisk infeksjon og ondartethet. Den primære, immunologiske unormalitet som skrives seg fra infeksjon med HIV, er den
15 progressive utarming og funksjonelle forstyrrelse av T-lymfocytter som uttrykker CD4-celleoverflateglykoproteinet (Lane et al., Ann. Rev. Immunol., 3:477 (1985)). Tapet av CD4-hjelper/-induksjons-T-cellefunksjon ligger sannsynligvis under de store defektene i cellulær og humoral immunitet som fører til de
20 opportunistiske infeksjonene og ondartethetene som er karakteristiske for AIDS (H. Lane, *supra*).

Selv om mekanismen ved HIV-assosiert ITP er ukjent, antas den å være forskjellig fra mekanismen til ITP som ikke er forbundet med HIV-infeksjon. (Walsh et al., N. Eng. J.
25 Med., 311:635-639 (1984); og Ratner, Am. J. Med., 86:194-198 (1989)).

IV. Nåværende behandling for trombocytopeni

Den terapeutiske fremgangsmåte for behandlingen av
30 pasienter med trombocytopeni er diktert av alvorligheten ved og hastverket i den kliniske situasjon. Behandlingen er lik for HIV-assosiert og ikke-HIV-relatert trombocytopeni, og selv om en rekke forskjellige terapeutiske fremgangsmåter er blitt brukt, forblir behandlingen kontroversiell.

35 Blodplateantall hos pasienter diagnostisert med trombocytopeni, er med hell blitt forøkt ved hjelp av glukokortikoidbehandling (f.eks. prednisolon), hos de fleste pasientene er imidlertid responsen ufullstendig, eller tilbakefall inn-

trer når glukokortikoiddosen reduseres eller dens administrering avbrytes. Basert på studier med pasienter som har HIV-assosiert ITP, har noen forskere foreslått at glukokortikoidterapi kan resultere i predisposisjon for AIDS. Glukokortikoider administreres vanligvis dersom blodplateantall faller under $20 \times 10^9/\text{liter}$, eller når spontan blødning inntreffer.

For pasienter som er følsomme for glukokortikoider, er forbindelsen: 4-(2-klorfenyl)-9-metyl-2-[3-(4-morfolinyl)-3-propanon-1-yl]-6H-tieno[3,2,f][1,2,4]triazolo[4,3,a][1,4]-diazepin (WEB 2086) med hell blitt brukt til å behandle et alvorlig tilfelle av ikke-HIV-assosiert ITP. En pasient med blodplateantall på $37\ 000\text{--}58\ 000/\mu\text{l}$ ble behandlet med WEB 2086, og etter 1-2 ukers behandling økte blodplateantall til $140\ 000\text{--}190\ 000/\mu\text{l}$. (EP 361 077 og Lohmann et al., Lancet, 1147 (1988)).

Selv om den optimale behandling for ervervet amegakaryocytisk trombocytopeni purpura (AATP) er usikker, er antithymocytglobulin (ATG), et hesteserum mot humant thymusvev, blitt påvist å gi langvarig, fullstendig remisjon (Trimble et al., Am. J. Hematol., 37:126-127 (1991)). En nyere rapport indikerer imidlertid at hematopoeseeffektene av ATG kan tilskrives timerosal hvor proteinet sannsynligvis virker som en kvikksølvbærer (Panella et al., Cancer Research, 50:4429-4435 (1990)).

Gode resultater er blitt rapportert med splenektomi. Splenektomi fjerner hovedsetet for blodplateødeleggelse og en hovedkilde for autoantistoffproduksjon hos mange pasienter. Denne fremgangsmåten resulterer i langvarige, behandlingsfrie remisjoner hos et stort antall pasienter. Ettersom kirurgiske fremgangsmåter imidlertid generelt skal unngås hos immunkompromitterte pasienter, anbefales splenektomi bare ved alvorlige tilfeller av trombocytopeni (f.eks. alvorlig HIV-assosiert ITP), hos pasienter som ikke gir respons på 2 til 3 ukers glukokortikoidbehandling, eller ikke får langvarig respons etter avbrudd i glukokortikoidadministrering. Basert på nåværende vitenskapelig kunnskap, er det uklart hvorvidt splenektomi predisponerer pasienter for AIDS.

I tillegg til prednisolonterapi og splenektomi opp-

viser også visse cytotoksiske midler, f.eks. vincristin, og azidotymidin (AZT, zidovudin), løfterike resultater ved behandling av HIV-indusert ITP; resultatene er imidlertid prelinære.

5 Av det ovenfor nevnte vil det forstås at én måte å behandle trombocytopeni på ville være å oppnå et middel som er i stand til å akselerere differensieringen og modningen av megakaryocytter eller forløpere derav til en blodplateproduserende form. Betydelige anstrengelser er blitt brukt på å
10 identifisere et slikt middel, vanligvis henvist til som "trombopoietin" (TPO). Andre navn på TPO som vanligvis finnes i litteraturen, omfatter: trombocytopoesestimulerende faktor (TSF), megakaryocyttkolonistimulerende faktor (MK-CSF), megakaryocytstimulerende faktor og megakaryocytspotensiator. TPO-
15 aktivitet ble observert så tidlig som i 1959 (Rak et al., Med. Exp., 1:125), og forsøk på å karakterisere og rense dette midlet har fortsatt helt frem til i dag. Selv om rapporter om delvis rensing av TPO-aktive polypeptider foreligger (se f.eks. Tayrien et al., J. Biol. Chem., 262:3262 (1987) og
20 Hoffman et al., J. Clin. Invest. 75:1174 (1985)), har andre postulert at TPO ikke er en atskilt enhet i seg selv, men snarere er ganske enkelt den polyfunksjonelle manifestasjon av et kjent hormon (IL-3, Sparrow et al., Prog. Clin. Biol. Res., 215:123 (1986)). Uansett dets form eller opprinnelse ville et
25 molekyl som har trombopoeseaktivitet, være av betydelig terapeutisk verdi. Selv om ikke noe protein er blitt utvetydig identifisert som TPO, omgis den nyere oppdagelse at *mpl*, en putativ cytokinreseptor, kan overføre et trombopoeseignal, av betydelig interesse.

30

V.*Mpl* er en megakaryocytopoesecytokinreseptor

Det menes at proliferasjonen og modningen av hematopoesecceller er nøye regulert av faktorer som positivt eller negativt modulerer flerpotensiell stamcelleproliferasjon og
35 flerlinjedifferensiering. Disse effektene formidles gjennom høyaffinitetsbindingen av ekstracellulære proteinfaktorer til spesifikke celleoverflatereseptorer. Disse celleoverflatereseptorene har til felles betydelig homologi og klassifiseres

generelt som medlemmer av cytokinreseptorsuperfamilien. Medlemmene av superfamilien omfatter reseptorer for: IL-2 (β - og γ -kjeder) (Hatakeyama et al., Science, 244:551-556 (1989); Takeshita et al., Science, 257:379-382 (1991)); IL-3 (Itoh et al., Science, 247:324-328 (1990); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:5459-5463 (1990); Kitamura et al., Cell, 66:1165-1174 (1991a); Kitamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5082-5086 (1991b)), IL-4 (Mosley et al., Cell, 59:335-348 (1989)), IL-5 (Takaki et al., EMBO J., 9:4367-4374 (1990); Tavernier et al., Cell, 66:1175-1184 (1991)), IL-6 (Yamasaki et al., Science, 241:825-828 (1988); Hibi et al., Cell, 63:1149-1157 (1990)), IL-7 (Goodwin et al., Cell, 60:941-951 (1990)), IL-9 (Renault et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5690-5694 (1992)), granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) (Gearing et al., EMBO J., 8:3667-3676 (1991); Hayashida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 244:9655-9659 (1990)), granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF) (Fukunaga et al., Cell, 61:341-350 (1990a); Fukunaga et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8702-8706 (1990b); Larsen et al., J. Exp. Med., 172:1559-1570 (1990)), EPO (D'Andrea et al., Cell, 57:277-285 (1989); Jones et al., Blood, 76:31-35 (1990)), leukemiihitorfaktor (LIF) (Gearing et al., EMBO J., 10:2839-2848 (1991)), onkostatin M (OSM) (Rose et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8641-8645 (1991)) og også reseptorer for prolaktin (Boutin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7744-7748 (1988); Ederly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2112-2116 (1989)), veksthormon (GH) (Leung et al., Nature, 330:537-543 (1987)) og ciliær, nøytratrof faktor (CNTF) (Davis et al., Science, 253:59-63 (1991)).

Medlemmer av cytokinreseptorfamilien kan grupperes i tre funksjonelle kategorier (for en oversikt, se Nicola et al., Cell, 67:1-4 (1991)). Den første klassen omfatter enkeltkjedereseptorer, slik som erythropoietinreseptor (EPO-R) eller reseptor for granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF-R), som binder ligand med høy affinitet via det ekstracellulære domene og også frembringer et intracellulært signal. En andre klasse av reseptorer, såkalte α -underenheter, omfatter interleukin-6-reseptor (IL6-R), reseptor for granulocyttmakrofag-

kolonistimulerende faktor (GM-CSF-R), interleukin-3-reseptor (IL3-R α) og andre medlemmer av cytokinreseptorsuperfamilien. Disse α -underenhetene binder ligand med lav affinitet, men kan ikke overføre et intracellulært signal. En høyaffinitetsreseptor som er i stand til å gi signal, frembringes ved hjelp av en heterodimer mellom en α -underenhet og et medlem av en tredje klasse av cytokinreseptorer, kalt β -underenheter, f.eks. β_c , den felles β -underenhet for de tre α -underenhetene IL3-R α og GM-CSF-R.

Bevis for at *mpl* er et medlem av cytokinreseptorsuperfamilien kommer fra sekvenshomologi (Gearing, EMBO J., 8:3667-3676 (1988); Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6834-6938 (1990); Davis et al., Science, 253:59-63 (1991) og Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-5644 (1992)) og dens evne til å omsette proliferative signaler.

Utleidet proteinsekvens fra molekylær kloning av murin *c-mpl* avslører at dette proteinet er homologt med andre cytokinreseptorer. Det ekstracellulære domene inneholder 465 aminosyrerester og er sammensatt av to underdomener, hvert med fire sterkt konserverte cysteiner og et bestemt motiv i det N-terminale underdomene og i det C-terminale underdomene. De ligandbindende, ekstracellulære domener forutsis å ha lignende, doble, β -sylinderfoldede, strukturelle geometrier. Dette doble, ekstracellulære domene er svært homologt med den signalomsettende kjede som er felles for IL-3-, IL-5- og GM-CSF-reseptorer samt det lavaffinitetsbindende domene i LIF (Vigon et al., Oncogene, 8:2607-2615 (1993)). *Mpl* kan således tilhøre lavaffinitetsligandbindingsklassen av cytokinreseptorer.

En sammenligning mellom murin *mpl* og moden, human *mpl*-P avslører at disse to proteinene oppviser 81% sekvensidentitet. Nærmere bestemt har de N-terminale og C-terminale, ekstracellulære underdomener til felles henholdsvis 75% og 80% sekvensidentitet. Det mest konserverte *mpl*-område er cytoplasmadomenet som oppviser 91% aminosyreidentitet, med en sekvens på 37 rester nær transmembrandomenet som er identisk i begge artene. Følgelig rapporteres *mpl* å være ett av de mest konserverte medlemmer av cytokinreseptorsuperfamilien (Vigon,

supra).

Bevis for at *mpl* er en funksjonell reseptor som er i stand til å omdanne et proliferativt signal, kommer fra konstruksjon av kimære reseptorer som inneholder et ekstracellulært domene fra en cytokinreseptor med høy affinitet for et kjent cytokin med det *mpl*-cytoplasmatiske domene. Ettersom det ikke er blitt rapportert noen kjent ligand for *mpl*, var det nødvendig å konstruere det kimære, høyaffinitetsligandbindende, ekstracellulære domene fra en cytokinreseptor fra klasse én, slik som IL-4R eller G-CSFR. Vigon et al., *supra*, fusjonerte det ekstracellulære domene i G-CSFR med både transmembran- og cytoplasmadomenet i *c-mpl*. En IL-3-avhengig cellelinje, BAF/B03 (Ba/F3), ble transfektert med G-CSFR/*mpl*-kimærene sammen med en fullengde-G-CSFR-kontroll. Celler transfektert med kimærene, vokste like godt i nærvær av cytokin IL-3 eller G-CSF. Likeledes vokste også celler transfektert med G-CSFR godt i enten IL-3 eller G-CSF. Alle cellene døde i fravær av vekstfaktorer. Et lignende forsøk ble utført av Skoda et al., EMBO J., 12(7):2645-2653 (1993) hvor både de ekstracellulære og transmembrandomenene i human-IL-4-reseptor (hIL-4-R) ble fusjonert til det murine *mpl*-cytoplasmatiske domene, og transfektert inn i en murin IL-3-avhengig Ba/F3-cellelinje. Ba/F3-celler transfektert med villtype-hIL-4-R, prolifererte normalt i nærvær av begge de artsspesifikke IL-4 og IL-3. Ba/F3-celler transfektert med hIL-4R/*mpl*, prolifererte normalt i nærvær av hIL-4 (i nærvær eller fravær av IL-3), noe som viser at det *mpl*-cytoplasmatiske domene i Ba/F3-celler inneholder alle elementene som er nødvendige for å omdanne et proliferativt signal.

Disse kimærforsøkene viser den proliferasjonssignalgivende evne til det *mpl*-cytoplasmatiske domene, men sier ingenting med hensyn til hvorvidt det *mpl*-ekstracellulære domene kan binde en ligand. Disse resultatene er i overensstemmelse med minst to muligheter, nemlig at *mpl* er en enkeltkjede- (klasse én) reseptor som EPO-R eller G-CSFR, eller det er en signalomdannende β -underenhet (klasse tre) som krever en α -underenhet som IL-3 (Skoda et al., *supra*).

VI. *Mpl*-ligand er et trombopoietin (TPO)

Som beskrevet ovenfor, er det blitt foreslått at serum inneholder en unik faktor, noen ganger henvist til som trombopoietin (TPO), som virker synergistisk med forskjellige andre cytokiner slik at vekst og modning av megakaryocytter fremmes. Det er aldri blitt isolert noen slik naturlig faktor fra serum eller noen annen kilde, selv om betydelige anstrengelser er blitt gjort av et stort antall grupper. Selv om det ikke er kjent hvorvidt *mpl* er i stand til direkte å binde en megakaryocytstimulerende faktor, viser nyere forsøk at *mpl* er involvert i proliferativ signalomdannelse fra en faktor eller faktorer som finnes i serumet til pasienter med aplastisk benmarg (Methia et al., Blood, 82(5):1395-1401 (1993)).

Bevis for at en unik serumkolonidannende faktor som er forskjellig fra IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, SCF, EPO, G-CSF og GM-CSF omdanner et proliferativt signal gjennom *mpl*, kommer fra undersøkelse av fordelingen av *c-mpl*-ekspresjon i primitive og engasjerte hematopoesecellelinjer og fra *mpl*-antisense-studier i én av disse cellelinjene.

Ved å bruke reverstranskriptase (RT)-PCR i immunologisk rensede humanhematopoeseceller, demonstrerte Methia et al., *supra*, at sterke *mpl*-mRNA-budskap bare ble funnet i CD34⁺-rensedede celler, megakaryocytter og blodplater. CD34⁺-celler renses fra benmarg (BM), utgjør ca. 1% av alle BM-celler og anrikes i primitive og engasjerte forløpere til alle linjer (f.eks. erytroid, granulomakrofag og megakaryocytisk).

Mpl-antisense-oligodeoksynukleotider ble påvist å undertrykke megakaryocytisk kolonidannelse fra de flerpotente CD34⁺-celler dyrket i serum fra pasienter med aplastisk marg (en rik kilde for megakaryocytiskolonistimulerende aktivitet (MK-CSA)). Disse samme antisense-oligodeoksynukleotider hadde ingen effekt på erytroid- eller granulomakrofagkolonidannelse.

Hvorvidt *mpl* bandt en ligand direkte og hvorvidt serumfaktoren som er påvist å forårsake megakaryocyttopoese virket gjennom *mpl*, var fortsatt ukjent. Det er imidlertid blitt foreslått at dersom *mpl* bandt en ligand direkte, var det sannsynlig at dens aminosyresekvens var svært konserverv og har arts-kryssreaktivitet på grunn av den betydelige sekvens-

identitet mellom human- og murin-*mpl*-ekstracellulære domener (Vigon et al., *supra* (1993)).

VII. Formål

5 På bakgrunn av det ovenfor nevnte, vil det forstås at det er et nåværende og vedvarende behov innen teknikken for å isolere og identifisere molekyler som er i stand til å stimulere proliferasjon, differensiering og modning av hematopoese-celler, spesielt megakaryocytter eller deres avkom, for tera-
10 peutisk anvendelse ved behandlingen av trombocytopeni. Det menes at et slikt molekyl er en *mpl*-ligand, og således foreligger et ytterligere behov for å isolere én eller flere slike ligander for å evaluere deres rolle(r) i cellevekst og -differensiering.

15 Det er følgelig et formål ved denne oppfinnelsen å oppnå et farmasøytisk rent molekyl som er i stand til å stimulere proliferasjon, differensiering og/eller modning av megakaryocytter til den modne, blodplateproduserende form.

Det er et annet formål å tilveiebringe molekylet i en
20 form for terapeutisk anvendelse ved behandlingen av en hematopoese-forstyrrelse, spesielt trombocytopeni.

Det er et ytterligere formål ved foreliggende oppfin-
nelse å isolere, rense og spesifikt identifisere protein-
ligander som er i stand til å binde *in vivo* en cytokinsuper-
25 familiereseptor kjent som *mpl*, og å omdanne et proliferativt signal.

Det er nok et annet formål å tilveiebringe nukleinsyremolekyler som koder for slike proteinligander, og å an-
vende disse nukleinsyremolekylene til å produsere *mpl*-bindende
30 ligander i rekombinant cellekultur for diagnostisk og terapeutisk anvendelse.

Det er nok et annet formål å tilveiebringe derivater og modifiserte former av proteinligandene, inkludert aminosyresekvensvarianter, variantglykoproteinformer og kovalente
35 derivater derav.

Det er et ytterligere formål å tilveiebringe fusjons-
polypeptidformer som kombinerer en *mpl*-ligand og et heterologt protein og kovalente derivater derav.

Det er nok et ytterligere formål å tilveiebringe variantpolypeptidformer som kombinerer en *mpl*-ligand med aminosyreaddisjoner og -substitusjoner fra EPO-sekvensen, for å fremstille et protein som er i stand til å regulere proliferasjon og vekst av både blodplater og røde blodcelleforløpere.

Det er nok et ytterligere formål å fremstille immungener for frembringelse av antistoffer mot *mpl*-ligander eller fusjonsformer derav, samt å oppnå antistoffer som er i stand til å binde slike ligander.

Disse og andre formål ved oppfinnelsen vil være åpenbare for fagfolk etter vurdering av beskrivelsen som et hele.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter isolert *mpl*-ligandpolypeptid, kjennetegnet ved at det omfatter aminosyresekvensen SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL (SEKV. ID. NR.: 30) eller SPAPPACDPRLNKLRRDDHVLHGR (SEKV. ID. NR.: 31) og er biologisk aktiv.

Videre omfatter oppfinnelsen isolert nukleinsyremolekyl kjennetegnet ved at det koder for polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnelsen omfatter også ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter nukleinsyren ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter videre vertscelle kjennetegnet ved at den er transformert med ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen.

Også omfattet av oppfinnelsen er fremgangsmåte for fremstilling av *mpl*-ligand, kjennetegnet ved at den omfatter ekspresjon av nukleinsyren ifølge foreliggende oppfinnelse i en egnet vertscelle.

Oppfinnelsen omfatter også antistoff, kjennetegnet ved at det har evnen til å binde *mpl*-ligandpolypeptidet ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter videre farmasøytisk preparat for behandling eller forebyggelse av trombocytopeni, kjennetegnet ved at det omfatter et *mpl*-ligandpolypeptid

ifølge foreliggende oppfinnelse og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Formålene ved oppfinnelsen er oppnådd ved å tilveiebringe et isolert pattedyrmegakaryocytopoeseproliferasjons- og modningsfremmende protein, kalt "*mpl*-ligand" (ML) eller "trombopoietin" (TPO), som er i stand til å stimulere proliferasjon, modning og/eller differensiering av megakaryocytter til den modne, blodplatedannende form.

Dette hovedsakelig homogene protein kan renses fra en naturlig kilde ved hjelp av en fremgangsmåte som omfatter: (1) å bringe et kildeplasma inneholdende *mpl*-ligandmolekylene som skal renses i kontakt med et immobilisert reseptorpolypeptid, nærmere bestemt *mpl* eller et *mpl*-fusjonspolypeptid immobilisert på en bærer, under betingelser hvorved *mpl*-ligandmolekylene som skal renses, adsorberes selektivt på det immobiliserte reseptorpolypeptid, (2) å vaske det immobiliserte reseptorpolypeptid og dets bærer for å fjerne ikke-adsorbert materiale, og (3) å eluere *mpl*-ligandmolekylene fra det immobiliserte reseptorpolypeptid som de er adsorbert til, med en elueringsbuffer. Fortrinnsvis er den naturlige kilde pattedyrplasma eller -urin som inneholder *mpl*-liganden. Eventuelt er pattedyret aplastisk, og den immobiliserte reseptor er en *mpl*-IgG-fusjon.

Eventuelt er det foretrukne, megakaryocytopoeseproliferasjons- og -modningsfremmende protein et isolert, i det vesentlige homogent *mpl*-ligandpolypeptid laget ved hjelp av syntetiske eller rekombinante midler.

"*Mpl*-ligand"-polypeptidet eller "TPO" ifølge denne oppfinnelsen har fortrinnsvis minst 70% total sekvensidentitet med aminosyresekvensen til det høyrensedde, i det vesentlige homogene, porcine *mpl*-ligandpolypeptid og minst 80% sekvensidentitet med "EPO-domenet" til det porcine *mpl*-ligandpolypeptid. Eventuelt er *mpl*-liganden ifølge denne oppfinnelsen moden human-*mpl*-ligand (hML) som har den modne aminosyresekvens tilveiebrakt i figur 1 (SEKV. ID NR. 1) eller en variant eller posttranskripsjonelt modifisert form derav eller et protein som har ca. 80% sekvensidentitet med den modne human-*mpl*-ligand. Eventuelt er *mpl*-ligandvarianten et fragment, spesielt

et aminoende- eller "EPO-domene"-fragment, av den modne human-*mpl*-ligand (hML). Fortrinnsvis bibeholder aminoendefragmentet i det vesentlige hele human-ML-sekvensen mellom den første og fjerde cysteinrest, men kan inneholde vesentlige addisjoner, delesjoner eller substitusjoner utenfor dette området. Ifølge denne utførelsesformen kan fragmentpolypeptidet representeres ved formelen:

$$X\text{-hML}(7\text{-}151)\text{-Y}$$

hvor hML(7-151) er den humane TPO- (hML) aminosyresekvens fra Cys⁷ til og med Cys¹⁵¹; X er aminogruppen til Cys⁷ eller én eller flere av aminoendeaminosyrerestene til den modne hML eller aminosyrerestforlengelsene til denne, slik som Met, Tyr eller ledersekvenser som inneholder f.eks. proteolytiske spaltings seter (f.eks. faktor Xa eller trombin); og Y er den karboksyterminale gruppe i Cys¹⁵¹ eller én eller flere karboksyendeaminosyrerester i den modne hML eller forlengelser til denne.

Eventuelt kan *mpl*-ligandpolypeptidet eller fragmentet derav være fusjonert til et heterologt polypeptid (kimære). Et foretrukket, heterologt polypeptid er et cytokin, en kolonistimulerende faktor eller interleukin eller fragment derav, spesielt sett-ligand (KL), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, EPO, GM-CSF eller LIF. Et eventuelt foretrukket, heterologt polypeptid er en immunglobulinkjede, spesielt humant IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, IgM eller fragment derav, spesielt omfattende det konstante domene i en IgG-tungkjede.

Et annet aspekt tilveiebringer et preparat som omfatter en isolert *mpl*-agonist som er biologisk aktiv, og som fortrinnsvis er i stand til å stimulere inkorporeringen av merkede nukleotider (f.eks. ³H-tymidin) i DNA-en til IL-3-avhengige Ba/F3-celler transfektert med human-*mpl*. Eventuelt er *mpl*-agonisten biologisk aktiv *mpl*-ligand og er fortrinnsvis i stand til å stimulere inkorporeringen av ³⁵S i blodplater i blodomløpet i en museblodplategjebundet analyse. Egnert *mpl*-agonist omfatter hML₁₅₃, hML(R153A, R154A), hML2, hML3, hML4,

mML, mML2, mML3, pML og pML2 eller fragmenter derav.

Ved en annen utførelsesform tilveiebringer denne oppfinnelsen et isolert antistoff som er i stand til å bindes til *mpl*-liganden. Det isolerte antistoff som er i stand til å
5 binde til *mpl*-liganden, kan eventuelt fusjoneres til et andre polypeptid, og antistoffet eller fusjonen derav kan brukes til å isolere og rense *mpl*-ligand fra en kilde som beskrevet ovenfor for immobilisert *mpl*. Ved et ytterligere aspekt av denne utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte
10 for påvisning av *mpl*-liganden *in vitro* eller *in vivo*, som omfatter å bringe antistoffet i kontakt med en prøve, spesielt en serumprøve, som mistenkes for å inneholde liganden, og påvise om binding har inntrådt.

Ved enda ytterligere utførelsesformer tilveiebringer
15 oppfinnelsen et isolert nukleinsyremolekyl som koder for *mpl*-liganden eller fragmentene derav, hvor nukleinsyremolekylet eventuelt kan være merket med en påvisbar rest, og et nukleinsyremolekyl som har en sekvens som er komplementær til, eller hybridiserer under middels til svært strenge betingelser med,
20 et nukleinsyremolekyl som har en sekvens som koder for en *mpl*-ligand. Foretrukne nukleinsyremolekyler er de som koder for human, porcin og murin *mpl*-ligand, og omfatter RNA og DNA, både genomisk og cDNA. Ved et ytterligere aspekt av denne utførelsesformen er nukleinsyremolekylet DNA som koder for *mpl*-
25 liganden, og som videre omfatter en replikerbar vektor hvor DNA-en er operativt bundet til kontrollsekvenser som gjenkjennes av en vert transformert med vektoren. Eventuelt er DNA-en cDNA med sekvensen som er gitt i fig. 1 5'-3' (SEKV. ID NR. 2), 3'-5' eller et fragment derav. Dette aspekt omfatter
30 videre vertsceller, fortrinnsvis CHO-celler, som er transformert med vektoren, og en fremgangsmåte for å anvende DNA-en til å bevirke produksjon av *mpl*-ligand, fortrinnsvis som omfatter å uttrykke cDNA-en som koder for *mpl*-liganden i en kultur av de transformerte vertscellene og utvinne *mpl*-liganden
35 fra vertscellene eller vertscellekulturen. *Mpl*-liganden fremstilt på denne måte, er fortrinnsvis human *mpl*-ligand.

Det er også beskrevet en fremgangsmåte for isolering og rensing av TPO (ML) fra en TPO-produserende mikroorganisme,

som omfatter:

- (1) oppbrytning eller lysering av celler som inneholder TPO,
- (2) eventuelt separering av oppløselig materiale fra uoppløselig materiale som inneholder TPO,
- (3) oppløseliggjøring av TPO i det uoppløselige materiale med en oppløseliggjøringsbuffer,
- (4) separering av en oppløseliggjort TPO fra annet oppløselig og uoppløselig materiale,
- (5) gjenfolding av TPO i en redox-buffer, og
- (6) separering av korrekt foldet TPO fra feilfoldet TPO.

Fremgangsmåten sørger for oppløseliggjøring av det uoppløselige materiale som inneholder TPO med et kaotropt middel hvor det kaotrope middel er valgt fra et salt av guanidin, natriumtiocyanat, og urea. Fremgangsmåten sørger videre for at oppløseliggjort TPO skilles fra annet oppløselig og uoppløselig materiale ved hjelp av ett eller flere trinn valgt fra sentrifugering, gelfiltrering og reversfasekromatografi. Gjenfoldingstrinnet i fremgangsmåten sørger for en redox-buffer som inneholder både et oksidasjons- og reduksjonsmiddel. Generelt er oksidasjonsmidlet oksygen eller en forbindelse som inneholder minst én disulfidbinding, og reduksjonsmidlet er en forbindelse som inneholder minst ett fritt sulfhydryl. Oksidasjonsmidlet velges fortrinnsvis fra oksidert glutation (GSSG) og cystin, og reduksjonsmidlet velges fra redusert glutation (GSH) og cystein. Mest foretrukket er oksidasjonsmidlet oksidert glutation (GSSG), og reduksjonsmidlet er redusert glutation (GSH). Det er også foretrukket at det molare forhold for oksidasjonsmidlet er likt eller høyere enn for reduksjonsmidlet. Redox-bufferen inneholder i tillegg en detergent, fortrinnsvis valgt fra CHAPS og CHAPSO, som er til stede ved et nivå på minst 1%. Redox-bufferen inneholder i tillegg NaCl, fortrinnsvis i et konsentrasjonsområde på ca. 0,1-0,5 M, og glyserol, fortrinnsvis ved en konsentrasjon som er høyere enn 15%. pH-verdien til redox-bufferen ligger fortrinnsvis i området fra ca. pH 7,5 til pH 9,0, og gjenfoldingstrinnet utføres ved 4 °C i 12-48 timer. Gjenfoldingstrinnet gir biolog-

isk aktiv TPO hvor en disulfidbinding er dannet mellom Cys-resten nærmest aminoenden og Cys-resten nærmest karboksyenden av EPO-domenet.

Det er videre beskrevet en fremgangsmåte for rensing av biologisk aktivt TPO fra en mikroorganisme som omfatter:

- (1) å lysere minst den ekstracellulære membran i mikroorganismen,
- (2) å behandle lysatet som inneholder TPO, med et kaotropt middel,
- (3) å gjenfolde TPO-et, og
- (4) å fraskille urenheter og feilfoldet TPO fra korrekt foldet TPO.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser den utledede aminosyresekvens (SEKV. ID NR. 1) til human *mpl*-ligand (hML)-cDNA og den kodende nukleotidsekvens (SEKV. ID NR. 2). Nukleotider er nummerert ved begynnelsen av hver linje. De 5'- og 3'-utranslaterte områder er angitt med små bokstaver. Aminosyrerester er nummerert over sekvensen, med start i Ser 1 i proteinsekvensen til den modne *mpl*-ligand (ML). Grensene til antatt exon 3 er angitt ved hjelp av pilene, og de potensielle N-glykosyleringssteder er innrammet. Cysteinrester er angitt ved hjelp av en prikk over sekvensen. Den understrekede sekvens tilsvarer den N-terminale sekvens bestemt ut fra *mpl*-ligand rensset fra porcint plasma.

Figur 2 viser fremgangsmåten brukt til *mpl*-ligand-³H-tymidininkorporeringsanalysen. For å bestemme tilstedeværelsen av *mpl*-ligand fra forskjellige kilder ble *mpl*-P-Ba/F3-cellene sulteføret på IL-3 i 24 timer i en fuktet inkubator ved 37 °C i 5% CO₂ og luft. Etter IL-3-sulteføring ble cellene platet ut i 96-brønners kulturskåler med eller uten fortynnede prøver og dyrket i 24 timer i en cellekulturinkubator. 20 µl serumfritt RPMI-medium inneholdende 1 µCi ³H-tymidin, ble tilsatt til hver brønn i de siste 6-8 timer. Cellene ble så innhøstet på 96-brønners filterplater og vasket med vann. Filtrene ble så tallet.

Figur 3 viser effekten av pronase, DTT og varme på evnen til APP når det gjelder å stimulere Ba/F3-*mpl*-cellepro-

liferasjon. For pronasefordøyelse av APP ble pronase (Boehringer Mannheim) eller bovint serumalbumin koblet til "Affi-gel 10" (Biorad), og det ble inkubert individuelt med APP i 18 timer ved 37 °C. Deretter ble harpiksene fjernet ved sentrifugering og supernatantene analysert. APP ble også varmet opp til 80 °C i 4 minutter eller fikk 100 µM DTT etterfulgt av dialyse mot PBS.

Figur 4 viser elueringen av *mpl*-ligandaktivitet fra "Phenyl-Toyopearl"-, "Blue-Sepharose"- og "Ultralink"-*mpl*-kolonner. Fraksjonene 4-8 fra *mpl*-affinitetskolonnen var toppaktivitetsfraksjonene eluert fra kolonnen.

Figur 5 viser SDS-PAGE av eluerte "Ultralink"-*mpl*-fraksjoner. Til 200 µl av hver fraksjon 2-8 ble det tilsatt 1 ml aceton inneholdende 1 mM HCl ved -20 °C. Etter 3 timer ved -20 °C ble prøver sentrifugert, og resulterende pellets ble vasket to ganger med aceton ved -20 °C. Acetonpelletene ble deretter oppløst i 30 µl SDS-oppløseliggjøringsbuffer, ført til 100 µM DTT og varmet opp ved 90 °C i 5 minutter. Prøvene ble så oppløst på en 4-20% SDS-polyakrylamidgel, og proteiner ble visualisert ved hjelp av sølvfarging.

Figur 6 viser eluering av *mpl*-ligandaktivitet fra SDS-PAGE. Fraksjon 6 fra *mpl*-affinitetskolonnen ble oppløst på en 4-20% SDS-polyakrylamidgel under ikke-reduserende betingelser. Etter elektroforese ble gelen skåret opp i 12 like områder og elektroeluert som beskrevet i eksemplene. De elektroeluerte prøver ble dialysert i PBS og analysert ved en 1/20 fortykning. Mr-standardene som ble brukt for å kalibrere gelen, var "Novex Mark 12"-standarder.

Figur 7 viser effekten av *mpl*-liganduttømt APP på human megakaryocytopoese. *Mpl*-liganduttømt APP ble laget ved å sende 1 ml over en 1 ml *mpl*-affinitetskolonne (700 µg *mpl*-IgG/ml "NHS-superose", Pharmacia). Humane periferstamcellekulturer ble laget til 10% APP eller 10% *mpl*-liganduttømt APP og dyrket i 12 dager. Megakaryocytopoese ble kvantifisert som beskrevet i eksemplene.

Figur 8 viser effekten av *mpl*-IgG på stimuleringen av human megakaryocytopoese ved hjelp av APP. Humane periferstamcellekulturer ble laget 10% med APP og dyrket i 12 dager. På

dag 0, 2 og 4 ble *mpl*-IgG (0,5 µg) eller ANP-R-IgG (0,5 µg) tilsatt. Etter 12 dager ble megakaryocytopoese kvantifisert som beskrevet i eksemplene. Gjennomsnittet av prøver in duplo er fremstilt grafisk med de aktuelle dobbeltdata i parentes.

Figur 9 viser begge trådene til et 390 bp stort fragment av human genom-DNA som koder for *mpl*-liganden. Den utledede aminosyresekvens til "exon 3" (SEKV. ID NR. 3), den kodende sekvens (SEKV. ID NR. 4), og dens komplement (SEKV. ID NR. 5) er vist.

Figur 10 viser utledet aminosyresekvens for moden human-*mpl*-ligand (hML) (SEKV. ID NR. 6) og modent humanerytropoietin (hEPO) (SEKV. ID NR. 7). Den forutsagte aminosyresekvens for human-*mpl*-liganden er stilt opp ved siden av humanerytropoietinsekvensen. Identiske aminosyrer er innrammet, og åpninger innført for optimal sammenstilling, er angitt ved hjelp av prikker. Potensielle N-glykosyleringsseter er understreket med en sammenhengende linje for hML og med en brutt linje for hEPO. De to cysteinene som er viktige for erytropoietinaktivitet, er angitt ved hjelp av en stor prikk.

Figur 11 viser utledet aminosyresekvens for modne human-*mpl*-ligandisoformer hML (SEKV. ID NR. 6), hML2 (SEKV. ID NR. 8), hML3 (SEKV. ID NR. 9) og hML4 (SEKV. ID NR. 10). Identiske aminosyrer er innrammet, og åpninger innført for optimal sammenstilling, er angitt ved hjelp av prikker.

Figurene 12A, 12B og 12C viser effekten av human-*mpl*-ligand på Ba/F3-*mpl*-celleproliferasjon (A), human megakaryocytopoese *in vitro* kvantifisert under anvendelse av et radioaktivt merket, murint, monoklonalt IgG-antistoff som er spesifikt for megakaryocytglykoproteinet GPIIb/IIIa (B), og murin trombopoese målt i en blodplategjennbundet analyse (C).

293 celler ble transfektert ved hjelp av CaPO₄-metoden (Gorman, C i DNA Cloning: A New Approach 2:143-190 (1985)) med pRK5-vektor alene, pRK5-hML eller pRK5-ML₁₅₃ over natten (pRK5-ML₁₅₃ ble frembrakt ved å innføre et stoppkodon etter rest 153 i hML ved hjelp av PCR). Mediet ble så kondisjonert i 36 timer og analysert med hensyn på stimulering av celleproliferasjon av Ba/F3-*mpl* som beskrevet i eksempel 1 (A) eller human megakaryocytopoese *in vitro* (B). Megakaryocyto-

poese ble kvantifisert under anvendelse av et ^{125}I radioaktivt merket, murint, monoklonalt IgG-antistoff (HP1-1D) mot det megakaryocyttspesifikke glykoprotein GPII_bIII_a som beskrevet (Grant et al., Blood 69:1334-1339 (1987)). Effekten av delvis
 5 rensset, rekombinant ML (rML) på blodplateproduksjon *in vivo* (C) ble bestemt ved å anvende analysen med gjenbundet trombocytose beskrevet av McDonald, T.P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 144:1006-10012 (1973). Delvis rensset rML ble fremstilt fra 200 ml kondisjonert medium inneholdende den rekombinante
 10 ML. Mediet ble sendt gjennom en 2 ml "Blue-Sepharose"-kolonne ekvilibrert i PBS, og kolonnen ble vasket med PBS og eluert med PBS inneholdende 2 M hver av urea og NaCl. Den aktive fraksjon ble dialysert i PBS og gjort til 1 mg/ml med endotoksinfri BSA. Prøven inneholdt mindre enn én enhet endotoksin/-
 15 ml. Mus ble injisert med enten 64 000, 32 000 eller 16 000 enheter rML eller eksipiens alene. Hver gruppe besto av 6 mus. Gjennomsnittet og standardavviket for hver gruppe er vist. p-verdier ble bestemt ved hjelp av en 2-halet T-test som sammenligner medianer.

20 Figur 13 sammenligner effekten av human-*mpl*-ligand-isoformer og varianter i Ba/F3-*mpl*-celleproliferasjonsanalysen. hML, mock, hML2, hML3, hML(R153A, R154A) og hML₁₅₃ ble analysert ved forskjellige fortynninger som beskrevet i eksempel 1.

25 Figurene 14A, 14B og 14C viser den utledede aminosyresekvens (SEKV. ID NR. 1) for human-*mpl*-ligand (hML) eller humant TPO (hTPO) og den humangenom-DNA-kodende sekvens (SEKV. ID NR. 11). Nukleotider og aminosyrerester er nummerert ved begynnelsen av hver linje.

30 Figur 15 viser en SDS-PAGE av rensset 293-rhML₃₃₂ og rensset 293-rhML₁₅₃.

 Figur 16 viser nukleotidsekvensen: cDNA-kodende (SEKV. ID NR. 12) og utledet aminosyresekvens (SEKV. ID NR. 13) for den åpne leseramme i en murin ML-isoform. Denne modne,
 35 murine *mpl*-ligandisoform inneholder 331 aminosyrerester, fire færre enn den putative fullengde-mML, og er derfor betegnet mML2. Nukleotider er nummerert ved begynnelsen av hver linje. Aminosyrerester er nummerert over sekvensen ved å starte med

Ser 1. De potensielle N-glykosyleringsseter er understreket. Cysteinrester er angitt ved hjelp av en prikk over sekvensen.

Figur 17 viser cDNA-sekvensen (SEKV. ID NR. 14) og den forutsagte proteinsekvens (SEKV. ID NR. 15) for denne murine ML-isoform (mML). Nukleotider er nummerert ved begynnelsen av hver linje. Aminosyrerester er nummerert over sekvensen og starter med Ser 1. Denne modne, murine *mpl*-ligand-isoform inneholder 335 aminosyrerester og menes å være fullengde-*mpl*-liganden, betegnet mML. Signalsekvensen er angitt med en prikket understrekning, og det sannsynlige spaltingspunkt er merket med en pil. 5'- og 3'-utranslaterte områder er angitt med små bokstaver. De to delesjoner som finnes som et resultat av alternativ spleising (mML2 og mML3), er understreket. De fire cysteinrestene er angitt ved hjelp av en prikk. De syv potensielle N-glykosyleringsseter er innrammet.

Figur 18 sammenligner den utledede aminosyresekvens for den humane ML-isoform hML3 (SEKV. ID NR. 9) og en murin ML-isoform betegnet mML3 (SEKV. ID NR. 16). Den forutsagte aminosyresekvens for human-*mpl*-liganden er sammenstilt med den murine *mpl*-ligandsekvens. Identiske aminosyrer er innrammet, og åpninger innført for optimal sammenstilling, er angitt ved hjelp av prikker. Aminosyrer er nummerert ved begynnelsen av hver linje.

Figur 19 sammenligner de forutsagte aminosyresekvenser for modne ML-isoformer fra muse-ML (SEKV. ID NR. 17), porcin-ML (SEKV. ID NR. 18) og human-ML (SEKV. ID NR. 6). Aminosyresekvenser er sammenstilt med åpninger, angitt ved hjelp av prikker, innført for optimal sammenstilling. Aminosyrer er nummerert ved begynnelsen av hver linje med identiske rester innrammet. Potensielle N-glykosyleringsseter er angitt ved hjelp av en skravert boks, og cysteinrester er betegnet med en prikk. Det konserverte, tobasiske aminosyremotiv som utgjør et potensielt proteasespaltingssete, er understreket. 4-aminosyrersdelesjonen funnet å opptre i alle tre arter (ML2), er fremhevet med en uthevet boks.

Figur 20 viser cDNA-sekvensen (SEKV. ID NR. 19) og forutsagt, moden proteinsekvens (SEKV. ID NR. 18) for en porcin ML-isoform (pML). Denne porcine *mpl*-ligandisoform inne-

holder 332 aminosyrerester og menes å være fullengde-porcin-*mpl*-liganden, betegnet pML. Nukleotider er nummerert ved begynnelsen av hver linje. Aminosyrerester er nummerert over sekvensen ved å starte med Ser 1.

5 Figur 21 viser cDNA-sekvensen (SEKV. ID NR. 20) og forutsagt, moden proteinsekvens (SEKV. ID NR. 21) for en porcine ML-isoform (pML2). Denne porcine *mpl*-ligandisoform inneholder 328 aminosyrerester og er en fire-resters delesjonsform av fullengde-porcin-*mpl*-liganden, betegnet pML2. Nukleotider
10 er nummerert ved begynnelsen av hver linje. Aminosyrerester er nummerert over sekvensen ved å starte med Ser 1.

Figur 22 sammenligner den utledede aminosyresekvens for fullengde-porcine-ML-isoformen pML (SEKV. ID NR. 18) og en porcine ML-isoform betegnet pML2 (SEKV. ID NR. 21). Den forutsagte aminosyresekvens for pML er sammenstilt med pML2-sekvens. Identiske aminosyrer er innrammet, og åpninger innført for optimal sammenstilling, er angitt ved hjelp av prikker. Aminosyrer er nummerert ved begynnelsen av hver linje.

Figur 23 viser de relevante trekk for plasmid
20 pSVI5.ID.LL.MLORF ("fullengde" eller TPO₃₃₂) brukt til å transfektere vert-CHO-DP12-celler for produksjon av CHO-rhTPO₃₃₂.

Figur 24 viser de relevante trekk for plasmid
pSVI5.ID.LL.MLEPO-D ("avkortet" eller TPO₁₅₃) brukt til å transfektere vert-CHO-DP12-celler for produksjon av CHO-
25 rhTPO₁₅₃.

Figurene 25A, 25B og 25C viser effekten av *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹, 153) på blodplater (A), røde blodlegemer (B) og (C) hvite blodlegemer hos normale mus. To grupper av 6 C57-B6-hunnmus ble injisert daglig med enten PBS-buffer eller 0,3 µg
30 *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹, 153) (100 µl sc.). På dag 0 og på dagene 3-7 ble 40 µl blod tatt fra øyehulen. Dette blodet ble umiddelbart fortynnet i 10 ml kommersielt fortynningsmiddel, og komplette blodtelling ble oppnådd på et "Serrono Baker Hematology Analyzer 9018". Dataene er vist som gjennomsnitt ± standardfeil
35 ved gjennomsnittet.

Figurene 26A, 26B og 26C viser effekten av *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹, 153) på blodplater (A), røde blodlegemer (B) og (C) hvite blodlegemer hos subletalt bestrålte mus. To grupper å

10 C57-B6-hunnmus ble bestrålt subletalt med 750 cGy gamma-stråling fra en ^{137}Cs -kilde og injisert daglig med enten PBS-buffer eller $3,0 \mu\text{g}$ *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹, 153) (100 μl sc.). På dag 0 og ved etterfølgende, mellomliggende tidspunkter ble 40 μl blod tatt fra øyehulen. Dette blodet ble umiddelbart fortynnet i 10 ml kommersielt fortynningsmiddel, og komplette blodtelling-
 5 linger ble oppnådd på et "Serrono Baker Hematology Analyzer 9018". Dataene er vist som gjennomsnitt $\pm$ standardfeil ved gjennomsnittet.

10 Figurene 27A, 27B og 27C viser effekten av CHO-rhTPO₃₃₂ på (A) blodplater (trombocytter), (B) røde blodlegemer (erytrocytter) og (C) hvite blodlegemer (leukocytter) hos normale mus. To grupper à 6 C57-B6-hunnmus ble injisert daglig med enten PBS-buffer eller $0,3 \mu\text{g}$ CHO-rhTPO₃₃₂ (100 μl sc.). På
 15 dag 0 og på dagene 3-7 ble 40 μl blod tatt fra øyehulen. Dette blodet ble umiddelbart fortynnet i 10 ml kommersielt fortynningsmiddel, og komplette blodtelling-
 20 linger ble oppnådd på et "Serrono Baker Hematology Analyzer 9018". Dataene er vist som gjennomsnitt $\pm$ standardfeil ved gjennomsnittet.

20 Figur 28 viser doseresponskurver for forskjellige former av rhTPO oppnådd fra forskjellige cellelinjer. Doseresponskurver ble konstruert til rhTPO fra de følgende cellelinjer: hTPO₃₃₂ fra CHO (fullengde fra kinesiske hamsterovarier-celler); hTPO_{Met⁻¹ 153} (*E. coli*-avledet, avkortet form med et N-terminalt metionin); hTPO₃₃₂ (fullengde TPO fra human-293-
 25 celler); Met-manglende 155 *E. coli* (den avkortede form (rhTPO₁₅₅) uten det terminale metionin fra *E. coli*). Grupper à 6 C57B6-hunnmus ble injisert daglig i 7 dager med rhTPO avhengig av gruppe. Hver dag ble 40 μl blod tatt fra øyehulen for
 30 komplette blodtelling. Dataene vist ovenfor, er de maksimale effektene som ses med de forskjellige behandlinger, og med unntak av (met 153 *E. coli*) skjedde dette på dag 7 av behandlingen. I den tidligere nevnte "met 153 *E. coli*"-gruppe ble den maksimale effekt sett på dag 7. Dataene er vist som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik ved gjennomsnittet.
 35

Figur 29 viser doseresponskurver som sammenligner aktiviteten av fullengde- og "klippede" former av rhTPO produsert i CHO-celler med den avkortede form fra *E. coli*. Grupper

å 6 C57B6-hunnmus ble injisert daglig med 0,3 µg rhTPO av forskjellige typer. På dagene 2-7 ble 40 µl blod tatt fra øyehulen for komplette blodtelling. Behandlingsgrupper var TPO₁₅₃, den avkortede form av TPO fra *E. coli*; TPO₃₃₂ (blandet fraksjon), fullengde-TPO som inneholder omtrent 80-90% fullengde- og 10-20% klippede former; TPO₃₃₂ (30K fraksjon) = renset, klippet fraksjon fra det opprinnelige "blandet"-preparat; TPO₃₃₂ (70K fraksjon) = renset fullengde-TPO-fraksjon fra det opprinnelige "blandet"-preparat. Dataene er vist som
 10 gjennomsnitt ± standardavvik ved gjennomsnittet.

Figur 30 er en tegneserie som viser KIRA-ELISA-analysen for måling av TPO. Figuren viser MPL/Rse.gD-kimæren og relevante deler av opphavsreseptorene samt sluttkonstruksjonen (høyre del av figuren) og et strømningsdiagram (venstre del av
 15 figuren) som viser relevante trinn i analysen.

Figur 31 er et strømningskart for KIRA-ELISA-analysen som viser hvert trinn i fremgangsmåten.

Figurene 32A-32L gir nukleotidsekvensen (SEKV. ID NR. 22) til pSVI17.ID.LL-ekspresjonsvektoren brukt for ekspresjon
 20 av Rse.gD i eksempel 17.

Figur 33 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP1.

Figur 34 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP21.

25 Figur 35 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP151.

Figur 36 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP202.

30 Figur 37 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP172.

Figur 38 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP210.

Figur 39 er en tabell over de fem best uttrykkende TPO-kloner fra pMP210-plasmidbanken (SEKV. ID NR. 23, 24, 25,
 35 26, 27 og 28).

Figur 40 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP41.

Figur 41 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP41.

lingen av plasmid pMP57.

Figur 42 er en skjematisk fremstilling av fremstillingen av plasmid pMP251.

5 Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

I. Definisjoner

Generelt har de følgende ord og uttrykk den angitte definisjon når de er brukt i beskrivelsen, eksemplene og kravene.

- 10 "Kaotropt middel" henviser til en forløper som, i vandig oppløsning og i passende konsentrasjoner, kan forårsake en endring i den romlige konfigurasjon eller konformasjon til et protein ved i det minste delvis å bryte kreftene som er ansvarlige for opprettholdelse av den normale sekundær- og
- 15 tertiærstruktur til proteinet. Slike forbindelser omfatter f.eks. urea, guanidin-HCl og natriumtiocyanat. Høye konsentrasjoner, vanligvis 4-9 M, av disse forbindelsene, er normalt påkrevet for å utøve den konformasjonelle effekt på proteiner.

- "Cytokin" er et generisk uttrykk for proteiner frigjort av én cellepopulasjon som virker på en annen celle som
- 20 intercellulære mediatorer. Eksempler på slike cytokiner er lymfokiner, monokiner og tradisjonelle polypeptidhormoner. Inkludert blant cytokinene er veksthormon, insulinlignende vekstfaktorer, humant veksthormon, humant N-metionyl-veksthormon, bovin veksthormon, paratyreoïdhormon, tyroksin, insulin,
- 25 proinsulin, relaxin, prorelaxin, glykoproteinhormoner slik som follikkelstimulerende hormon (FSH), tyreoidstimulerende hormon (TSH) og luteiniserende hormon (LH), hematopoesevekstfaktor, hepatisk vekstfaktor, fibroblastvekstfaktor, prolaktin,
- 30 placentallaktogen, tumornekrosefaktor- α (TNF- α og TNF- β), mulderianinhiberende stoff, musegonadotropinassosiert peptid, inhibin, aktivin, vaskulær endotelvekstfaktor, integrin, nervevekstfaktorer slik som NGF- β , blodplatevekstfaktor, transformerende vekstfaktorer (TGF-er) slik som TGF- α og TGF- β ,
- 35 insulinlignende vekstfaktor-I og -II, erytropoietin (EPO), osteoinduktive faktorer, interferoner slik som interferon- α , - β og - γ , kolonistimulerende faktorer (CSF-er) slik som makrofag-CSF (M-CSF), granulocyttmakrofag-CSF (GM-CSF) og granulo-

cytt-CSF (G-CSF), interleukiner (IL-er), slik som IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 og andre polypeptidfaktorer, inkludert LIF, SCF og sett-ligand. Slik de er her brukt, er de ovenfor nevnte uttrykk
 5 ment å omfatte proteiner fra naturlige kilder eller fra rekombinant cellekultur. Likeledes er uttrykkene ment å omfatte biologisk aktive ekvivalenter som f.eks. atskiller seg i aminosyresekvens med én eller flere aminosyrer eller i type eller omfang av glykosylering.

10 "Mpl-ligand", "mpl-ligandpolypeptid", "ML", "trombopoietin" eller "TPO" er her brukt avvekslende og omfatter ethvert polypeptid som har egenskapen å binde til *mpl*, et medlem av cytokinreseptorsuperfamilien, som har en biologisk egenskap til ML som definert nedenunder. En eksempelvis bio-
 15 logisk egenskap er evnen til å stimulere inkorporeringen av merkede nukleotider (f.eks. ³H-tymidin) i DNA-en til IL-3-avhengige Ba/F3-celler transfektert med human-*mpl*-P. En annen eksempelvis biologisk egenskap er evnen til å stimulere inkorporeringen av ³⁵S i blodplater i blodomløpet, i en museblod-
 20 plategjenbundet analyse. Denne definisjonen omfatter polypeptidet isolert fra en *mpl*-ligandkilde, slik som aplastisk, porcint plasma som her er beskrevet, eller fra en annen kilde, slik som en annen dyreart, inkludert mennesker, eller fremstilt ved hjelp av rekombinante eller syntetiske metoder, og
 25 omfatter variantformer, inkludert funksjonelle derivater, fragmenter, alleler, isoformer og analoger derav.

Et "*mpl*-ligandfragment" eller "TPO-fragment" er en del av en naturlig forekommende, moden fullengde-*mpl*-ligand eller TPO-sekvens hvor én eller flere aminosyrerester eller
 30 karbohydratenheter er fjernet. Den eller de fjernede aminosyrerester kan opptre hvor som helst i peptidet, inkludert enten i N-enden eller C-enden, eller innvendig. Fragmentet vil ha til felles minst én biologisk egenskap med *mpl*-ligand. *Mpl*-ligandfragmenter vil vanligvis ha en sammenhengende sekvens
 35 med minst 10, 15, 20, 25, 30 eller 40 aminosyrerester som er identiske med sekvensene til *mpl*-liganden isolert fra et pattedyr, inkludert liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma eller human- eller murinliganden, spesielt EPO-domenet.

derav. Representative eksempler på N-terminale fragmenter er hML₁₅₃ eller TPO(Met⁻¹1-153).

"Mpl-ligandvarianter" eller "mpl-ligandsekvensvarianter" betyr, slik de her er definert, en biologisk aktiv mpl-ligand som definert nedenunder med mindre enn 100% sekvensidentitet med mpl-liganden isolert fra rekombinant cellekultur eller aplastisk, porcint plasma, eller humanliganden som har den utledede sekvens beskrevet i figur 1 (SEKV. ID NR. 1). Vanligvis vil en biologisk aktiv mpl-ligand ha en aminosyresekvens med minst ca. 70% aminosyreidentitet med mpl-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma eller den modne, murine eller humane ligand eller fragmenter derav (se figur 1 (SEKV. ID NR. 1)), fortrinnsvis minst ca. 75%, mer foretrukket minst ca. 80%, enda mer foretrukket minst ca. 85%, ytterligere mer foretrukket minst ca. 90%, og mest foretrukket minst ca. 95%.

En "kimær mpl-ligand" er et polypeptid som omfatter fullengde-mpl-ligand eller ett eller flere fragmenter derav fusjonert eller bundet til et andre, heterologt polypeptid eller ett eller flere fragmenter derav. Kimæren vil ha til felles minst én biologisk egenskap med mpl-ligand. Det andre polypeptid vil vanligvis være et cytokin, immunglobulin eller fragment derav.

"Isolert mpl-ligand", "høyrenset mpl-ligand" og "i det vesentlige homogen mpl-ligand" brukes om hverandre og betyr en mpl-ligand som er blitt renset fra en mpl-ligandkilde, eller er blitt fremstilt ved hjelp av rekombinante eller syntetiske fremgangsmåter, og som er tilstrekkelig fri for andre peptider eller proteiner (1) til å oppnå minst 15 og fortrinnsvis 20 aminosyrerester i N-enden eller i en indre aminosyresekvens ved å anvende en sekvensator med roterende beholder, eller den beste, kommersielt tilgjengelige aminosyresekvensator som er markedsført, eller som modifisert ved hjelp av fremgangsmåter som var publisert på innleveringsdagen for søknaden, eller (2) inntil homogenitet ved hjelp av SDS-PAGE under ikke-reduserende eller reduserende betingelser under anvendelse av Coomassie-blått eller fortrinnsvis sølvfarge. Homogenitet betyr her mindre enn ca. 5% forurensning med proteiner fra annen kilde.

"Biologisk egenskap" betyr når det er brukt sammen med enten "*mpl*-liganden" eller "den isolerte *mpl*-ligand", at den har trombopoeseaktivitet eller har en effektor- eller antigen funksjon eller aktivitet *in vivo* som er direkte eller indirekte forårsaket eller utført av en *mpl*-ligand (enten i dens naturlig forekommende eller denaturerte konformasjon) eller et fragment derav. Effektorfunksjoner omfatter *mpl*-binding og hvilken som helst bærerbindende aktivitet, agonisme eller antagonisme for *mpl*, spesielt transduksjon av et proliferativt signal som omfatter replikasjon, DNA-regulatorfunksjon, modulasjon av den biologiske aktivitet av andre cytokiner, reseptoraktivering (spesielt cytokinaktivering), deaktivering, opp- eller nedregulering, cellevekst eller -differensiering, og lignende. En antigen funksjon betyr at den har en epitop eller et antigen setepunkt som er i stand til å kryssreagere med antistoffer frembrakt mot den naturlig forekommende *mpl*-ligand. Den viktigste antigene funksjon til et *mpl*-ligandpolypeptid er at det binder med en affinitet på minst ca. 10^6 l/mol til et antistoff frembrakt mot *mpl*-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma. Vanligvis binder polypeptidet med en affinitet på minst ca. 10^7 l/mol. Mest foretrukket er det antigen aktive *mpl*-ligandpolypeptid, et polypeptid som binder til et antistoff frembrakt mot *mpl*-liganden som har en av de ovenfor beskrevne effektorfunksjoner. Anti-stoffene brukt til å definere "biologisk aktiv", er polyklonale kaninantistoffer frembrakt ved å formulere *mpl*-liganden isolert fra rekombinant cellekultur eller aplastisk, porcint plasma i Freund's komplette adjuvans, injisere preparatet subkutan og forsterke immunresponsen ved hjelp av intraperitoneal injeksjon av preparatet inntil titeren for *mpl*-ligandantistoff flater ut.

"Biologisk aktiv" betyr når det brukes sammen med enten "*mpl*-liganden" eller "den isolerte *mpl*-ligand", en *mpl*-ligand eller et *mpl*-polypeptid som utøver trombopoeseaktivitet eller har til felles en effektorfunksjon av *mpl*-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma eller uttrykt i rekombinant cellekultur som her beskrevet. En vesentlig, kjent effektorfunksjon av *mpl*-liganden eller -polypeptidet som her er be-

skrevet, er binding til *mpl* og stimulering av inkorporeringen av merkede nukleotider (^3H -tymidin) i DNA-en til IL-3-avhengige Ba/F3-celler transfektert med human-*mpl*-P. En annen kjent effektorfunksjon til *mpl*-liganden eller -polypeptidet som her er beskrevet, er evnen til å stimulere inkorporeringen av ^{35}S i blodplater i blodomløpet, i en museblodplategjenbundet analyse. Nok en annen kjent effektorfunksjon for *mpl*-ligand er evnen til å stimulere *in vitro* human megakaryocytopoese som vil kunne kvantifiseres ved å anvende et radioaktivt merket, monoklonalt antistoff som er spesifikt for megakaryocytglykoproteinet GPIIbIIIa.

"Prosent aminosyresekvensidentitet" med hensyn til *mpl*-ligandsekvensen er her definert som prosentandelen av aminosyrerester i kandidatsekvensen som er identisk med restene i *mpl*-ligandsekvensen isolert fra aplastisk, porcint plasma, eller den murine eller humane ligand som har den utledede aminosyresekvens beskrevet i figur 1 (SEKV. ID NR. 1), etter sammenstilling av sekvensene og innføring av åpninger om nødvendig, for å oppnå den maksimale prosentsekvensidentitet, og ikke vurdere eventuelle konservative substitusjoner som del av sekvensidentiteten. Ingen av de N-terminale, C-terminale eller indre forlengelser, delesjoner eller innføyelser i *mpl*-ligandsekvensen skal betraktes som å påvirke sekvensidentitet eller homologi. Således omfatter eksempelvis, biologisk aktive *mpl*-ligandpolypeptider vurdert til å ha identiske sekvenser: prepro-*mpl*-ligand, pro-*mpl*-ligand og moden *mpl*-ligand.

"*Mpl*-ligandmikrosekvensering" kan utføres ved hjelp av hvilken som helst passende standardfremgangsmåte, forutsatt at fremgangsmåten er tilstrekkelig følsom. Ved én slik fremgangsmåte sekvenseres høyrenset polypeptid erholdt fra SDS-geler eller fra et slutt-HPLC-trinn, direkte ved hjelp av automatisert Edman-nedbrytning (fenylisotiocyanat) under anvendelse av en modell "470A Applied Biosystems" gassfasesekvensator utstyrt med et 120A fenyltiohydantoinaminyseanalyseapparat (PTH-aminosyreanalyseapparat). I tillegg vil *mpl*-ligandfragmenter fremstilt ved hjelp av kjemisk (f.eks. CNBr, hydroksylamin, 2-nitro-5-tiocyanoat) eller enzymatisk (f.eks. trypsin, clostripain, stafylokokk-protease) fordøyelse

etterfulgt av fragmentrensing (f.eks. HPLC), kunne sekvenseres på samme måte. PTH-aminosyrer analyseres under anvendelse av "ChromPerfect"-datasystemet (Justice Innovations, Palo Alto, CA). Sekvensfortolkning utføres på en "VAX 11/785 Digital Equipment Co." datamaskin som beskrevet av Henzel et al., J. Chromatography, 404:41-52 (1987). Eventuelt kan aliquoter av HPLC-fraksjoner elektroforesebehandles på 5-20% SDS-PAGE, elektrooverføres til en PVDF-membran (ProBlott, AIB, Foster City, CA) og farges med "Coomassie Brilliant Blue" (Matsur-diara, J. Biol. Chem., 262:10035-10038 (1987)). Et spesifikt protein identifisert ved hjelp av fargen, skjæres ut fra flekken, og N-terminal sekvensering utføres med gassfasesekvensator beskrevet ovenfor. For indre proteinsekvenser tørkes HPLC-fraksjoner under vakuum ("SpeedVac"), oppslemmes på nytt i passende buffere og fordøyes med cyanbromid, det Lys-spesifikke enzym Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA), eller Asp-N (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Etter fordøyelse sekvenseres de resulterende peptider som en blanding, eller fremkalles, etter HPLC-oppløsning på en C4-kolonne, med en propanolgradient i 0,1% TFA før gassfasesekvensering.

"Trombocytopeni" er definert som et ligandantall under 150×10^9 pr. liter blod.

"Trombopoeseaktivitet" er definert som biologisk aktivitet som består av akselerering av proliferasjonen, differensieringen og/eller modningen av megakaryocytter eller megakaryocytforløpere til den blodplateproduserende form av disse cellene. Denne aktiviteten kan måles ved forskjellige analyser, inkludert en analyse *in vivo* av gjenbundet museblodplate, analyse av induksjon av blodplatecelleoverflateantigen som målt ved hjelp av en anti-blodplate-immunoanalyse (anti-GPIIb/IIIa) for en humanleukemimegakaryoblastcellelinje (CMK) og induksjon av polyploidisering i en megakaryoblastcellelinje (DAMI).

"Trombopoietin" (TPO) er definert som en forbindelse med trombopoeseaktivitet eller som er i stand til å øke serumblodplateantall hos et pattedyr. TPO er fortrinnsvis i stand til å øke endogene blodplateantall med minst 10%, helst med 50%, og aller helst i stand til å forhøye blodplateantall hos

et menneske til mer enn 150×10^9 pr. liter blod.

"Isolert *mpl*-ligandnukleinsyre" er RNA eller DNA som inneholder mer enn 16 og fortrinnsvis 20 eller flere sekvensvise nukleotidbaser som koder for biologisk aktiv *mpl*-ligand
5 eller et fragment derav, er komplementær til RNA-en eller DNA-en, eller hybridiserer til RNA-en eller DNA-en og forblir stabilt bundet under middels til strenge betingelser. Denne RNA eller DNA er fri for minst én forurensende nukleinsyrekilde som den normalt er forbundet med i den naturlige kilde, og
10 fortrinnsvis i det vesentlige fri for enhver annen pattedyr-RNA eller -DNA. Uttrykket "fri for minst én forurensende nukleinsyrekilde som den normalt er forbundet med" omfatter tilfellet hvor nukleinsyren er til stede i kilden eller den naturlige celle, men befinner seg på et annet kromosomsted,
15 eller på annen måte er flankert av nukleinsyresekvenser som normalt ikke finnes i kildecellen. Et eksempel på isolert *mpl*-ligandnukleinsyre er RNA eller DNA som koder for en biologisk aktiv *mpl*-ligand som har til felles minst 75% sekvensidentitet, helst minst 80%, enda mer foretrukket minst 85%, ytterligere mer foretrukket 90%, og mest foretrukket 95% sekvensidentitet med human-, murin- eller porcin-*mpl*-liganden.

"Kontrollsekvenser" betyr når det henviser til ekspresjon, DNA-sekvenser som er nødvendige for ekspresjonen av en operativt bundet, kodende sekvens i en bestemt vertsorganisme. Kontrollsekvensene som er egnet for f.eks. prokaryoter,
25 omfatter en promoter, eventuelt en operatorsekvens, et ribosombindende sete og eventuelt andre, hittil dårlig forståtte sekvenser. Eukaryote celler er kjent for å gjøre bruk av promoterer, polyadenyleringssignaler og enhancere.

30 "Operativt bundet" betyr når det henviser til nukleinsyrer, at nukleinsyrene er plassert i et funksjonelt forhold til en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en forsekvens eller sekretorisk leder operativt bundet til DNA for et polypeptid dersom det uttrykkes som et preprotein
35 som deltar i utskillelsen av polypeptidet; en promoter eller enhancer er operativt bundet til en kodende sekvens dersom den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindende sete er operativt bundet til en kodende sekvens dersom

det er plassert slik at det letter translasjon. Generelt betyr "operativt bundet" at DNA-sekvensene som er bundet sammen, er tilgrensende, og i tilfellet med en sekretorisk leder, sammenhengende og i lesefase. Enhancere behøver imidlertid ikke å
5 være sammenhengende. Sammenbinding utføres ved ligering i passende restriksjonsseter. Dersom det ikke foreligger slike seter, brukes de syntetiske oligonukleotidadaptorene eller -linkerne i overensstemmelse med vanlig praksis.

"Eksogen" betyr når det henviser til et element, en
10 nukleinsyresekvens som er fremmed for cellen, eller homolog til cellen, men i en stilling innenfor vertscellenukleinsyren hvor elementet vanligvis ikke finnes.

"Celle", "cellelinje" og "cellekultur" brukes her om hverandre, og slike betegnelser omfatter alt avkom av en celle
15 eller cellelinje. Således omfatter f.eks. slike uttrykk som "transformanter" og "transformerte celler" den primære, angjeldende celle og kulturer avledet fra dem uten hensyn til antallet overføringer. Det skal også forstås at alt avkom ikke behøver å være nøyaktig identisk i DNA-innhold på grunn av
20 bevisste eller utilsiktede mutasjoner. Mutantavkom som har den samme funksjon eller biologisk aktivitet som det screenes for i den opprinnelig transformerte celle, er inkludert. Der hvor intensjonen er distinkte betegnelser, vil det være klart fra sammenhengen.

25 "Plasmider" er autonomt replikerende, ringformede DNA-molekyler som har uavhengige replikasjonsopprinnelsessteder, og betegnes her ved hjelp av en liten "p" som kommer etter og/eller etterfølges av store bokstaver og/eller tall. Utgangsplasmidene er her enten kommersielt tilgjengelige, al-
30 ment tilgjengelige på en ikke-begrenset basis, eller kan konstrueres fra slike tilgjengelige plasmider i overensstemmelse med publiserte fremgangsmåter. I tillegg er andre ekvivalent-plasmider kjent innen teknikken og vil være åpenbare for fagfolk innen teknikken.

35 "Restriksjonsenzymfordøyelse" betyr når det henviser til DNA, katalytisk spalting av indre fosfodiesterbindinger i DNA med et enzym som virker bare på visse steder eller seter i DNA-sekvensen. Slike enzymer kalles "restriksjonsendonukle-

aser". Hver restriksjonsendonuklease gjenkjenner en spesifikk DNA-sekvens kalt et "restriksjonssete" som har dobbeltsymmetri. De forskjellige restriksjonsenzymene som her er brukt, er kommersielt tilgjengelige, og deres reaksjonsbetingelser, kofaktorer og andre krav som er fastslått av enzymleverandørene, anvendes. Restriksjonsenzymmer betegnes vanligvis ved hjelp av forkortelser sammensatt av en stor bokstav etterfulgt av andre bokstaver som representerer mikroorganismen hvorfra hvert restriksjonsenzym opprinnelig ble erholdt, og så et nummer som betegner det bestemte enzym. Generelt brukes ca. 1 µg plasmid eller DNA-fragment med ca. 1-2 enheter enzym i ca. 20 µl bufferoppløsning. Passende buffere og substratmengder for bestemte restriksjonsenzymmer er spesifisert av produsenten. Inkubasjon i ca. 1 time ved 37 °C anvendes vanligvis, men kan variere i overensstemmelse med leverandørens instruksjoner. Etter inkubasjon fjernes protein eller polypeptid ved ekstraksjon med fenol og kloroform, og den fordøyde nukleinsyre utvinnes fra den vandige fraksjon ved utfelling med etanol. Fordøyelse med et restriksjonsenzym kan etterfølges av hydrolyse med bakteriell, alkalisk fosfatase av ende-5'-fosfatene for å forhindre de to-restriksjonsspaltede endene til et DNA-fragment fra "ringslutning" eller dannelsen av en lukket sløyfe som ville hemme innførelse av et annet DNA-fragment i restriksjonssetet. Med mindre annet er angitt, etterfølges fordøyelse av plasmider ikke av 5'-terminal defosforylering. Fremgangsmåter og reagenser for defosforylering er alminnelig kjent, som beskrevet i avsnittene 1.56-1.61 i Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

"Utvinning" eller "isolering" av et bestemt fragment av DNA fra en restriksjonsfordøyelse betyr separasjon av fordøyelsen på polyakrylamid- eller agarosegel ved hjelp av elektroforese, identifikasjon av fragmentet av interesse ved sammenligning av dets mobilitet med mobiliteten til markør-DNA-fragmenter med kjent molekylvekt, fjerning av gelsnittet som inneholder det ønskede fragment, og separasjon av gelen fra DNA. Denne fremgangsmåten er generelt kjent. For eksempel vises det til Lawn et al., Nucleic Acids Res., 9:6103-6114

(1981), og Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980).

"Southern-analyse" eller "Southern-blotting" er en fremgangsmåte hvorved tilstedeværelsen av DNA-sekvenser i en restriksjonsendonukleasefordøyelse av DNA eller DNA-holdig preparat bekreftes ved hybridisering til et kjent, merket oligonukleotid- eller DNA-fragment. Southern-analyse omfatter vanligvis elektroforetisk separasjon av DNA-fordøyelser på agarosegeler, denaturering av DNA-en etter elektroforetisk separasjon og overføring av DNA-en til nitrocellulose, nylon eller en annen egnet membranbærer for analyse med en radioaktivt merket, biotinylert eller enzymmerket probe som beskrevet i avsnittene 9.37-9.52 i Sambrook et al., *supra*.

"Northern-analyse" eller "Northern-blotting" er en fremgangsmåte som brukes til å identifisere RNA-sekvenser som hybridiserer til en kjent probe, slik som et oligonukleotid, DNA-fragment, cDNA eller fragment derav, eller RNA-fragment. Proben merkes med en radioaktiv isotop, slik som ^{32}P , eller ved biotinylering, eller med et enzym. RNA-en som skal analyseres, separeres vanligvis elektroforetisk på en agarose- eller polyakrylamidgel, overføres til nitrocellulose, nylon eller en annen egnet membran, og hybridiseres med proben, idet det anvendes standardteknikker som er godt kjent innen fagområdet, slik som de som er beskrevet i avsnittene 7.39-7.52 i Sambrook et al., *supra*.

"Ligering" er fremgangsmåten ved dannelse av fosfodiesterbindinger mellom to nukleinsyrefragmenter. For ligering av de to fragmentene må endene av fragmentene være forenlige med hverandre. I noen tilfeller vil endene være direkte forenlige etter endonukleasefordøyelse. Det kan imidlertid være nødvendig først å omdanne de forskjøvnede endene som vanligvis produseres etter endonukleasefordøyelse, til butte ender for å gjøre dem forenlige for ligering. For å gjøre endene butte, behandles DNA-en i en egnet buffer i minst 15 minutter ved 15 °C med ca. 10 enheter Klenow-fragment av DNA-polymerase I eller T4-DNA-polymerase i nærvær av de fire deoksyribonukleotidtrifosfatene. DNA-en renses så ved hjelp av fenol-kloroform-ekstraksjon og etanolutfelling. DNA-fragmentene som skal liggeres sammen, plasseres i oppløsning i omtrent like mengder.

Oppløsningen vil også inneholde ATP, ligasebuffer og en ligase, slik som T4-DNA-ligase ved ca. 10 enheter pr. 0,5 µg DNA. Dersom DNA-en skal ligeres i en vektor, gjøres vektoren først lineær ved fordøyelse med den eller de passende restriksjonsendonuklease(r). Det lineariserte fragment behandles så med bakteriell, alkalisk fosfatase eller kalvetarmfosfatase for å forhindre selvlivering under ligeringstrinnet.

"Fremstilling" av DNA fra celler betyr isolering av plasmid-DNA-en fra en kultur av vertscellene. Vanlig anvendte fremgangsmåter for DNA-fremstilling er stor- og småskalaplasmidfremstillingene beskrevet i avsnittene 1.25-1.33 i Sambrook et al., *supra*. Etter fremstilling av DNA-en kan den renses ved hjelp av fremgangsmåter som er godt kjent innen teknikken, slik som den som er beskrevet i avsnitt 1.40 i Sambrook et al., *supra*.

"Oligonukleotider" er korte, enkelt- eller dobbelt-trådede polydeoksynukleotider som syntetiseres kjemisk ved hjelp av kjente fremgangsmåter (slik som ved fosfotriester-, fosfitt- eller fosforamidittkjemi, under anvendelse av fast-faseteknikker, slik som beskrevet i EP 266 032, publisert 4. mai 1988, eller via deoksynukleosid-H-fosfonatmellomprodukter som beskrevet av Froehler et al., Nucl. Acids Res., 14:5399-5407 (1986)). Ytterligere fremgangsmåter omfatter polymerasekjedereaksjonen definert nedenunder og andre auto-primermetoder og oligonukleotidsynteser på faste bærere. Alle disse fremgangsmåtene er beskrevet i Engels et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734 (1989). Disse fremgangsmåtene anvendes dersom hele nukleinsyresekvensen i genet er kjent, eller sekvensen til nukleinsyren som er komplementær til den kodende tråd, er tilgjengelig. Alternativt kan man, dersom målaminosyresekvenser er kjent, utlede potensielle nukleinsyresekvenser under anvendelse av kjente og foretrukne, kodende rester for hver aminosyrerest. Oligonukleotidene renses så på polyakrylamidgeler.

"Polymerasekjedereaksjon" eller "PCR" henviser til en fremgangsmåte eller teknikk hvor små mengder av et bestemt stykke av nukleinsyre, RNA og/eller DNA, amplifiseres som beskrevet i US patentskrift nr. 4 683 195, bevilget 28. juli

1987. Generelt må sekvensinformasjon fra endene av området av interesse eller utenfor dette, være tilgjengelig, slik at oligonukleotidprimere kan utformes; disse primerne vil være identiske eller like i sekvens med motsatte tråder i templatet som skal amplifiseres. De 5'-terminale nukleotider til de to primerne kan stemme overens med endene til det amplifiserte materiale. PCR kan brukes til å amplifisere spesifikke RNA-sekvenser, spesifikke DNA-sekvenser fra total genom-DNA, og cDNA transkribert fra total, cellulær RNA, bakteriofag- eller plasmidsekvenser, etc. Se generelt Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987); Erlich, red., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989). Slik den her er brukt, anses PCR for å være ett, men ikke det eneste, eksempel på en nukleinsyrepolymerasereaksjonsfremgangsmåte for amplifisering av en nukleinsyretestprøve som omfatter bruken av en kjent nukleinsyre som en primer, og en nukleinsyrepolymerase for å amplifisere eller frembringe et bestemt stykke nukleinsyre.

"Strenge betingelser" er de som (1) gjør bruk av lav ionestyrke og høy temperatur for vasking, f.eks. 0,015 M NaCl/0,0015 M natriumsitrat/0,1% NaDodSO₄ (SDS) ved 50 °C, eller (2) under hybridisering gjør bruk av et denatureringsmiddel, slik som formamid, f.eks. 50% (vol/vol) formamid med 0,1% bovint serumalbumin/0,1% "Ficoll"/0,1% polyvinylpyrrolidon/50 mM natriumfosfatbuffer ved pH 6,5 med 750 mM NaCl, 75 mM natriumsitrat ved 42 °C. Et annet eksempel er anvendelse av 50% formamid, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M natriumsitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 6,8), 0,1% natriumpyrofosfat, 5 x Denhardts oppløsning, sonikert laksesperma-DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS og 10% dekstransulfat ved 42 °C, med vaskinger ved 42 °C i 0,2 x SSC og 0,1% SDS.

"Middels strenge betingelser" er beskrevet i Sambrook et al., *supra*, og omfatter bruken av en vaskeoppløsning og hybridiseringsbetingelser (f.eks. temperatur, ionestyrke og % SDS) som er mindre strenge enn beskrevet ovenfor. Et eksempel på middels strenge betingelser er slike betingelser som inkubasjon over natten ved 37 °C i en oppløsning som omfatter: 20% formamid, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trinatriumsitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 7,6), 5 x Denhardts oppløsning, 10% deks-

transulfat og 20 µl/ml denaturert, skjærkraftbehandlet lakse-sperma-DNA, etterfulgt av vasking av filtrene i 1 x SSC ved ca. 37-50 °C. Fagfolk innen teknikken vil vite hvordan man regulerer temperaturen, ionestyrken etc., for å tilpasse seg
 5 slike faktorer som probelengde og lignende.

"Antistoffer" (Ab-er) og "immunglobuliner" (Ig-er) er glykoproteiner som har de samme strukturelle karakteristika. Selv om antistoffer utviser bindingsspesifisitet til et bestemt antigen, omfatter immunglobuliner både antistoffer og
 10 andre antistofflignende molekyler som mangler antigenspesifisitet. Polypeptider av den siste typen produseres f.eks. ved lave nivåer ved hjelp av lymfesystemet og ved forhøyede nivåer ved hjelp av myelomer.

"Naturlig forekommende antistoffer og immunglobu-
 15 liner" er vanligvis heterotetramere glykoproteiner med ca. 150 000 dalton, sammensatt av to identiske, lette (L) kjeder og to identiske, tunge (H) kjeder. Hver lettkjede er bundet til en tungkjede ved hjelp av en kovalent disulfidbinding, mens antallet av disulfidbindinger varierer mellom de tunge
 20 kjedene til forskjellige immunglobulinisotyper. Hver tung- og lettkjede har også intrakjededisulfidbroer med regulær avstand. Hver tungkjede har i én ende et variabelt domene (V_H) etterfulgt av et antall konstante domener. Hver lettkjede har et variabelt domene i én ende (V_L) og et konstant domene i sin
 25 andre ende; det konstante domene i lettkjeden er sammenstilt med det første konstante domene i tungkjeden, og det variable lettkjededomene er sammenstilt med det variable domene i tungkjeden. Bestemte aminosyrerester menes å danne en grenseflate mellom de variable lett- og tungkjededomenene (Clothia et al.,
 30 J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985); Novotny og Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)).

Uttrykket "variabelt" henviser til det faktum at visse deler av de variable domenene atskiller seg mye i sekvens mellom antistoffer og brukes i bindingen og spesifisiteten til hvert bestemt antistoff for dets bestemte antigen.
 35 Variabiliteten er imidlertid ikke jevnt fordelt over de variable domenene til antistoffer. Den er konsentrert i tre segmenter kalt komplementaritetsbestemmende områder (CDR-er)

eller hypervariable områder, både i de variable lettkjede- og tungkjededomenene. De mer høykonserverte deler av variable domener kalles skjelettet (FR). De variable domenene til naturlig forekommende tung- og lettkjeder omfatter hver fire
 5 FR-områder som stort sett passer til en β -arkkonfigurasjon, knyttet sammen ved hjelp av tre CDR-er, som danner sløyfer som forbinder, og i noen tilfeller utgjør en del av, β -arkstrukturen. CDR-ene i hver kjede holdes sammen i nær tilknytning ved hjelp av FR-områdene og bidrar, sammen med CDR-ene fra den
 10 andre kjeden, til dannelsen av antigenbindingssetet til antistoffer (se Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). De konstante domenene er ikke involvert direkte i binding av et antistoff til et antigen, men utøver forskjellige effektorfunksjoner, slik som antistoffets deltakelse i
 15 antistoffavhengig, cellulær toksisitet.

Papainfordøyelse av antistoffer gir to identiske, antigenbindende fragmenter, kalt "Fab"-fragmenter, hvert med et enkelt antigenbindende sete, og et rest-"Fc"-fragment, hvis
 20 navn gjenspeiler dets evne til lett å utkrystallisere. Pepsinbehandling gir et $F(ab')_2$ -fragment som har to antigenkombinerende seter, og som fortsatt er i stand til å kryssbinde antigen.

"Fv" er det minimale antistofffragment som inneholder
 25 et komplett antigengjenkjennelses- og -bindingssete. Dette område består av en dimer av ett variabelt tung- og ett variabelt lettkjededomene i tett, ikke-kovalent forbindelse. Det er i denne konfigurasjon at de tre CDR-ene i hvert variabelt domene reagerer med hverandre for å definere et antigenbindende sete på overflaten av V_H - V_L -dimeren. Til sammen gir de
 30 seks CDR-ene antigenbindende spesifisitet til antistoffet. Selv et enkelt, variabelt domene (eller halvparten av et Fv som omfatter bare tre CDR-er som er spesifikke for et antigen) har imidlertid evnen til å gjenkjenne og binde antigen, riktig nok ved en lavere affinitet enn hele bindingssetet.
 35

Fab-fragmentet inneholder også det konstante domene til den lette kjede og det første, konstante domene (CH1) i tungkjeden. Fab'-fragmenter atskiller seg fra Fab-fragmenter

ved addisjonen av noen få rester i karboksyenden av tungkjede-CH1-domenet, inkludert ett eller flere cysteiner fra anti-stoffhengselsområdet. Fab'-SH er betegnelsen her for Fab' hvor cysteinresten(e) i de konstante domener bærer en fri tiol-gruppe. F(ab')₂-antistofffragmenter ble opprinnelig produsert som par av Fab'-fragmenter som har hengselscysteiner mellom seg. Det er også kjent andre kjemiske koblinger av anti-stofffragmenter.

"Lettkjedene" til antistoffer (immunglobuliner) fra hvilken som helst hvirveldyrart kan plasseres i én av to klart forskjellige typer, kalt kapp og lambda (λ), basert på aminosyresekvensene til deres konstante domener.

Avhengig av aminosyresekvensen til det konstante domene i deres tungkjeder, kan immunglobuliner plasseres i forskjellige klasser. Det er fem hovedklasser av immunglobuliner: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse kan oppdeles videre i underklasser (isotyper), f.eks. IgG-1, IgG-2, IgG-3 og IgG-4; IgA-1 og IgA-2. Tungkjedekonstantdomenene som tilsvare de forskjellige klassene av immunglobuliner, kalles henholdsvis α , delta, epsilon, γ og μ . Underenhetsstrukturene og de tredimensjonale konfigurasjonene til forskjellige klasser av immunglobuliner er vel kjent.

Uttrykket "antistoff" brukes i sin bredeste betydning og dekker spesifikt monoklonale enkeltantistoffer (inkludert agonist- og antagonistantistoffer), antistoffpreparater med polyepitopisk spesifisitet, samt antistofffragmenter (f.eks. Fab, F(ab')₂ og Fv), så lenge som de utviser sin ønskede, biologiske aktivitet.

Uttrykket "monoklonalt antistoff" henviser slik det her er brukt, til et antistoff erholdt fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. de individuelle antistoffene som omfatter populasjonen, er identiske, bortsett fra mulige, naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er høyspesifikke, idet de er rettet mot et enkelt, antigent sete. I motsetning til vanlige (polyklonale) antistoffpreparater som vanligvis omfatter forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er dessuten hvert monoklonalt

antistoff rettet mot en enkeltdeterminant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige ved at de syntetiseres ved hjelp av hybridomkulturen, uforurenset av andre immunglobuliner. Indeksen "monoklonalt" angir antistoffets karakter av å være erholdt fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke oppfattes som at det kreves fremstilling av antistoffet ved hjelp av noen bestemt fremgangsmåte. For eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal anvendes i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse, lages ved hjelp av hybridomfremgangsmåten som først er beskrevet av Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975), eller kan lages ved hjelp av fremgangsmåter med rekombinant DNA (se f.eks. US patentskrift nr. 4 816 567 (Cabilly et al.)).

De monoklonale antistoffene omfatter her nærmere bestemt "kimære" antistoffer (immunglobuliner) hvor en del av tung- og/eller lettkjeden er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en bestemt art, eller tilhørende en bestemt antistoffklasse eller -underklasse, mens det gjenværende av kjeden(e) er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra andre arter eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, samt fragmenter av slike antistoffer, så lenge som de utviser den ønskede, biologiske aktivitet (US patentskrift nr. 4 816 567 (Cabilly et al.); og Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

"Humaniserte" former av ikke-humant (f.eks. murine) antistoffer er kimære immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (slik som Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ eller andre antigenbindende sekvenser fra antistoffer) som inneholder minimal sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For mesteparten er humaniserte antistoffer humanimmunglobuliner (mottakerantistoff) hvor rester fra et komplementært, bestemmende område (CDR) i resipienten er erstattet med rester fra et CDR i en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte eller kanin med den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller er Fv-skjelettrestene til humanimmunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humanrester.

Humanisert antistoff kan dessuten omfatte rester som hverken finnes i resipientantistoffet eller i det innførte CDR eller skjelettsekvensene. Disse modifikasjonene gjøres for ytterligere å raffinere og optimalisere antistoffvirkning. Generelt vil det humaniserte antistoff omfatte i det vesentlige alt av minst ett, og vanligvis to, variable domener, hvor alt eller i det vesentlige alt av CDR-områdene tilsvarer de i et ikke-humant immunglobulin, og alt eller i det vesentlige alt av FR-områdene er de til en human immunglobulinkonsensussekvens. Det humaniserte antistoff vil optimalt også omfatte minst én del av et immunglobulinkonstantområde (Fc), vanligvis området til et humanimmunglobulin. For ytterligere detaljer, se Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); og Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)).

"Ikke-immunogent hos et menneske" betyr at det, etter å ha brakt polypeptidet i en farmasøytisk akseptabel bærer og i en terapeutisk effektiv mengde i kontakt med det passende vev hos et menneske, ikke kan påvises noen tilstand av sensitivitet eller resistens mot polypeptidet etter den andre administreringen av polypeptidet etter en passende latensperiode (f.eks. 8 til 14 dager).

II. Foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen

Foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen er i det vesentlige homogent polypeptid eller homogene polypeptider, henvist til som *mpl*-ligand(er) eller trombopoietin (TPO), som har egenskapen å binde til *mpl*, et medlem i reseptorcytokinsuperfamilien, og med den biologiske egenskap å stimulere inkorporeringen av merkede nukleotider (³H-tymidin) i DNA-en til IL-3-avhengige Ba/F3-celler transfektert med human *mpl*-P. Én eller flere foretrukne *mpl*-ligander er isolert fra pattedyrprotein(er) med hematopoese, spesielt megakaryocytopoese- eller trombocytopoeseaktivitet, nemlig som er i stand til å stimulere proliferasjon, modning og/eller differensiering av umodne megakaryocytter eller deres forløpere til den modne, blodplateproduserende form. Mest foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen er human-*mpl*-ligand(er),

inkludert fragmenter derav med hematopoese-, megakaryocytopoese- eller trombopoeseaktivitet. Eventuelt mangler disse human-*mpl*-ligand(er) glykosylering. Andre foretrukne human-*mpl*-ligander er "EPO-domenet" til hML, henvist til som hML₁₅₃ eller hTPO₁₅₃, en avkortet form av hML henvist til som hML₂₄₅ eller hTPO₂₄₅, og det modne fullengdepolypeptid med aminosyresekvensen vist i figur 1 (SEKV. ID NR. 1), henvist til som hML, hML₃₃₂ eller hTPO₃₃₂, og den biologisk aktive substitusjonsvarianten hML(R153A, R154A).

Eventuelt foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen er biologisk eller immunologisk aktive *mpl*-ligandvarianter valgt fra hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML og pML2.

Eventuelle, foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen er én eller flere biologisk aktive *mpl*-ligandvarianter som har en aminosyresekvens med minst 70% aminosyresekvensidentitet med human-*mpl*-liganden (se fig. 1 (SEKV. ID NR. 1)), murin-*mpl*-liganden (se fig. 16 (SEKV. ID NR. 12 & 13)), den rekombinante porcin-*mpl*-ligand (se fig. 19 (SEKV. ID NR. 18)) eller porcin-*mpl*-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma, fortrinnsvis minst 75%, helst minst 80%, enda mer foretrukket minst 85%, ytterligere mer foretrukket minst 90%, og mest foretrukket minst 95%.

Mpl-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma, har de følgende kjennetegn:

(1) den delvis rensede ligand eluerer fra en gelfiltreringskolonne kjørt i enten PBS, PBS inneholdende 0,1% SDS eller PBS inneholdende 4 M MgCl₂ med Mr på 60 000-70 000;

(2) ligandens aktivitet ødelegges av pronase;

(3) liganden er stabil ved lav pH (2,5), SDS ved 0,1% og 2 M urea;

(4) liganden er et glykoprotein basert på dens binding til flere forskjellige lektinkolonner;

(5) den høyrensede ligand eluerer fra ikke-reduisert SDS-PAGE med en Mr på 25 000-35 000. Mindre mengder aktivitet eluerer også med Mr på ca. 18 000-22 000 og 60 000;

(6) den høyrensede ligand oppløses på redusert SDS-PAGE som en dublett med Mr på 28 000 og 31 000;

(7) aminoendesequensen til båndene 18 000-22 000, 28 000 og 31 000 er den samme -SPAPPACDPRLNKLRRDDHVLHGR (SEKV. ID NR. 29); og

(8) liganden binder og eluerer fra de følgende af-
5 finitetskolonner:

"Blue-Sepharose",
"CM Blue-Sepharose",
"MONO-Q",
10 "MONO-S",
"Lentil lectin-Sepharose",
"WGA-Sepharose",
"Con A-Sepharose",
"Ether 650 m Toyopearl",
15 "Butyl 650 m Toyopearl",
"Phenyl 650 m Toyopearl" og
"Phenyl-Sepharose".

Mer foretrukne *mpl*-ligandpolypeptider er de som kodes
20 for av humant genom- eller cDNA med en aminosyresekvens beskrevet i fig. 1 (SEKV. ID NR. 1).

Andre foretrukne, naturlig forekommende, biologisk aktive *mpl*-ligandpolypeptider ifølge denne oppfinnelsen omfatter prepro-*mpl*-ligand, pro-*mpl*-ligand, moden *mpl*-ligand, *mpl*-
25 ligandfragmenter og glykosyleringsvarianter derav.

Ytterligere andre foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen omfatter *mpl*-ligandsekvensvarianter og -kimærer. Vanligvis er foretrukne *mpl*-ligandsekvensvarianter og -kimærer biologisk aktive *mpl*-ligandvarianter som har en
30 aminosyresekvens med minst 70% aminosyresekvensidentitet med human-*mpl*-liganden eller *mpl*-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma, fortrinnsvis minst 75%, mer foretrukket minst 80%, enda mer foretrukket minst 85%, ytterligere mer foretrukket minst 90% og mest foretrukket minst 95%. En eksempelvis,
35 foretrukket *mpl*-ligandvariant er en N-endedomene-hML-variant (henvist til som "EPO-domenet" på grunn av dens sekvenshomologi med erythropoietin). Det foretrukne hML-EPO-domene omfatter ca. de første 153 aminosyrerestene til moden hML og

henvises til som hML₁₅₃. En eventuelt foretrukket hML-sekvens-variant omfatter én hvor én eller flere av de basiske eller tobasiske aminosyrerestene i C-endedomenet er substituert med én eller flere ikke-basiske aminosyrerest(er) (f.eks. hydrofob, nøytral, sur, aromatisk, Gly, Pro og lignende). En foretrukket hML-C-endedomenesekvensvariant omfatter én hvor Arg-restene 153 og 154 er erstattet med Ala-rester. Denne varianten er henvist til som hML₃₃₂(R153A, R154A). En alternativ, foretrukket hML-variant omfatter enten hML₃₃₂ eller hML₁₅₃ hvor aminorestene 111-114 (QLPP eller LPPQ) er delert eller erstattet med en annen tetrapeptidsekvens (f.eks. AGAG eller lignende). Delesjonsmutantene ovenfor er henvist til som Δ4hML₃₃₂ eller Δ4hML₁₅₃.

En foretrukket kimære er en fusjon mellom *mpl*-ligand eller fragment derav (definert nedenunder) med et heterologt polypeptid eller fragment derav. For eksempel kan hML₁₅₃ fusjoneres til et IgG-fragment for å forbedre serumhalveringstiden, eller til IL-3, G-CSF eller EPO, for å fremstille et molekyl med forøkt trombopoese- eller kimærhematopoeseaktivitet.

En alternativ foretrukket human-*mpl*-ligandkimære er en "ML-EPO-domenekimære" som består av de N-terminale 153 til 157 hML-rester substituert med én eller flere, men ikke alle, av human-EPO-restene omtrent sammenstilt som vist i figur 10 (SEKV. ID NR. 7). Ved denne utførelsesformen vil hML-kimæren være ca. 153-166 rester lang hvor enkeltstående eller blokker av rester fra human-EPO-sekvensen er addert eller substituert i hML-sekvensen i stillinger som tilsvarer sammenstillingen vist i figur 10 (SEKV. ID NR. 6). Eksempelvis blokksekvensinnføyer i N-endedelen av hML vil omfatte ett eller flere av N-glykosyleringssetene i stillingene (EPO) 24-27, 38-40 og 83-85; én eller flere av de fire forutsagte, amfipatiske α-heliks buntene i stillingene (EPO) 9-22, 59-76, 90-107 og 132-152; og andre svært konserverte områder, inkludert N-ende- og C-endeområdene og reststillingene (epo) 44-52 (se f.eks. Wen et al., Blood, 82:1507-1516 (1993) og Boissel et al., J. Biol. Chem., 268(21):15983-15993 (1993)). Det forventes at denne "ML-EPO-domenekimære" vil ha blandet, biologisk trombopoese-

og erytropoeseaktivitet (TEPO-aktivitet).

Andre foretrukne polypeptider ifølge denne oppfinnelsen omfatter *mpl*-ligandfragmenter med en på hverandre følgende sekvens med minst 10, 15, 20, 25, 30 eller 40 aminosyrerester som er identiske med sekvensene til *mpl*-liganden isolert fra aplastisk, porcint plasma, eller den her beskrevne human-*mpl*-ligand (se f.eks. tabell 14, eksempel 24). Et foretrukket *mpl*-ligandfragment er human-ML[1-X] hvor X er 153, 164, 191, 205, 207, 217, 229 eller 245 (se figur 1 (SEKV. ID NR. 1) for sekvensen til restene 1-X). Andre foretrukne *mpl*-ligandfragmenter omfatter de som fremstilles som et resultat av kjemisk eller enzymatisk hydrolyse eller fordøyelse av den rensede ligand.

Et annet foretrukket aspekt ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for å rense *mpl*-ligandmolekyler som omfatter å bringe en *mpl*-ligandkilde som inneholder *mpl*-ligandmolekylene, i kontakt med et immobilisert reseptorpolypeptid, nærmere bestemt *mpl* eller et *mpl*-fusjonspolypeptid, under betingelser hvorved *mpl*-ligandmolekylene som skal renses, adsorberes selektivt på det immobiliserte reseptorpolypeptid, vaske den immobiliserte bærer for å fjerne ikke-adsorbert materiale, og eluere molekylene som skal renses, fra det immobiliserte reseptorpolypeptid med en elueringsbuffer. Kilden som inneholder *mpl*-liganden, kan være plasma hvor den immobiliserte reseptor fortrinnsvis er en *mpl*-IgG-fusjon.

Alternativt er kilden som inneholder *mpl*-liganden, rekombinant cellekultur hvor konsentrasjonen av *mpl*-ligand i enten dyrkningsmediet eller i cellelysaten er generelt høyere enn i plasma eller andre naturlige kilder. I dette tilfellet er den ovenfor beskrevne *mpl*-IgG-immunoaffinitetsmetode, selv om den fortsatt kan anvendes, vanligvis ikke nødvendig, og mer tradisjonelle proteinrensemeter som er kjent innen teknikken, kan anvendes. I korte trekk omfatter den foretrukne rensemeter for å tilveiebringe i det vesentlige homogen *mpl*-ligand: fjerning av partikkelrester, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, ved f.eks. sentrifugering eller ultrafiltrering; eventuelt kan protein konsentreres med et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter; etterfulgt av separering av liganden fra andre urenheter ved hjelp av ett eller

flere trinn valgt fra; immunoaffinitet, ionebytting (f.eks. DEAE eller matrikser som inneholder karboksymetyl- eller sulfopropylgrupper), "Blue-Sepharose", "CM Blue-Sepharose", "MONO-Q", "MONO-S", "lentil lectin-Sepharose", "WGA-Sepharose", "Con A-Sepharose", "Ether Toyopearl", "Butyl Toyopearl", "Phenyl Toyopearl", protein A-"Sepharose", SDS-PAGE, revers-fase-HPLC (f.eks. silikagel med påhengte, alifatiske grupper) eller "Sephadex"-molekylsikt- eller størrelsesutelukkelleskromatografi, og etanol- eller ammoniumsulfatutfelling. En slik proteaseinhibitor som metylsulfonylfluorid (PMSF) kan inkluderes i hvilket som helst av trinnene ovenfor for å inhibere proteolyse.

Ved en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer denne oppfinnelsen et isolert antistoff som er i stand til å binde *mpl*-liganden. Et foretrukket *mpl*-ligandisolert antistoff er monoklonalt (Kohler og Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); Campbell, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon et al., red., vol. 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); og Huse et al., Science, 246:1275-1281 (1989)). Foretrukket, *mpl*-ligandisolert antistoff er ett som binder til *mpl*-ligand med en affinitet på minst ca. 10^6 l/mol. Mer foretrukket binder antistoffet med en affinitet på minst ca. 10^7 l/mol. Mest foretrukket er antistoffet frembrakt mot *mpl*-liganden som har en av de ovenfor beskrevne effektorfunksjoner. Det isolerte antistoff som er i stand til å binde til *mpl*-liganden, kan eventuelt fusjoneres til et andre polypeptid, og antistoffet eller fusjonen derav kan brukes til å isolere og rense *mpl*-ligand fra en kilde som beskrevet ovenfor for immobilisert *mpl*-polypeptid. Ved et ytterligere foretrukket aspekt av denne utførelsesformen tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for påvisning av *mpl*-liganden *in vitro* eller *in vivo*, omfattende å bringe antistoffet i kontakt med en prøve, spesielt en serumprøve, som er mistenkt for å inneholde liganden, og påvise om binding har inntrådt.

Ved nok ytterligere, foretrukne utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen et isolert nukleinsyremolekyl som koder for *mpl*-liganden eller fragmenter derav, hvor nuklein-

syremolekylet kan være merket eller umerket med en påvisbar rest, og et nukleinsyremolekyl med en sekvens som er komplementær til, eller hybridiserer under strenge eller middels strenge betingelser med, et nukleinsyremolekyl med en sekvens
5 som koder for en *mpl*-ligand. En foretrukket *mpl*-ligandnukleinsyre er RNA eller DNA som koder for en biologisk aktiv *mpl*-ligand som har til felles minst 75% sekvensidentitet, mer foretrukket minst 80%, enda mer foretrukket minst 85%, ytterligere mer foretrukket 90%, og mest foretrukket 95% sekvensidentitet med human-*mpl*-liganden. Mer foretrukne, isolerte nukleinsyremolekyler er DNA-sekvenser som koder for biologisk aktiv *mpl*-ligand, valgt fra: (a) DNA basert på det kodende område til et pattedyr-*mpl*-ligandgen (f.eks. DNA som omfatter nukleotidsekvensen tilveiebrakt i figur 1 (SEKV. ID NR. 2)
15 eller fragmenter derav); (b) DNA som er i stand til å hybridisere til en DNA ifølge (a) under minst middels strenge betingelser; og (c) DNA som er degenerert til en DNA definert i (a) eller (b), som skriver seg fra degenereringen av den genetiske kode. Det forventes at de nye *mpl*-ligandene som her er
20 beskrevet, kan være medlemmer i en familie av ligander eller cytokiner som har en slik egnet sekvensidentitet at deres DNA kan hybridisere med DNA-en ifølge figur 1 (SEKV. ID NR. 2) (eller komplementet eller fragmenter derav) under lite til middels strenge betingelser. Et ytterligere aspekt ved denne
25 oppfinnelsen omfatter således DNA som hybridiserer under lite til middels strenge betingelser med DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptidene.

Ved en ytterligere foretrukket utførelsesform av denne oppfinnelsen er nukleinsyremolekylet cDNA som koder for
30 *mpl*-liganden, og omfatter videre en replikerbar vektor hvor cDNA-en er operativt bundet til kontrollsekvenser som gjenkjennes av en vert transformert med vektoren. Dette aspektet omfatter videre vertsceller transformert med vektoren og en fremgangsmåte for å anvende cDNA-en til å bevirke produksjon
35 av *mpl*-ligand, som omfatter å uttrykke den cDNA som koder for *mpl*-liganden i en kultur av de transformerte vertsceller, og utvinne *mpl*-liganden fra vertscellekulturen. *Mpl*-liganden fremstilt på denne måte, er fortrinnsvis i det vesentlige

homogen human-*mpl*-ligand. En foretrukket vertscelle for fremstilling av *mpl*-ligand er ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler).

5 III: Fremgangsmåter for fremstilling

Blodplateproduksjon har lenge vært ment av noen forfattere å være kontrollert av multippellinjespesifikke, humorale faktorer. Det er blitt postulert at to forskjellige cytokinaktiviteter henvist til som megakaryocyttkolonistimulerende faktor (meg-CSF) og trombopoietin, regulerer megakaryocytopoese og trombopoese (Williams et al., J. Cell Physiol., 100:101-104 (1982); Williams et al., Blood Cells, 15:123-133 (1989); og Gordon et al., Blood, 80:302-307 (1992)). Ifølge denne hypotesen stimulerer meg-CSF proliferasjonen av forløpermegakaryocytter, mens trombopoietin primært påvirker modning av mer differensierte celler og til sist blodplatefrigjørelse. Siden 1960-årene har induksjonen og fremkomsten av både meg-CSF- og trombopoietinaktiviteter i plasmaet, serumet og urinen til dyr og mennesker etter trombocytopeniske episoder, blitt godt dokumentert (Odell et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108:428-431 (1961); Nakeff et al., Acta Haematol., 54:340-344 (1975); Specter, Proc. Soc. Exp. Biol., 108:146-149 (1961); Schreiner et al., J. Clin. Invest., 49:1709-1713 (1970); Ebbe, Blood, 44:605-608 (1974); Hoffman et al., N. Engl. J. Med., 305:533 (1981); Straneva et al., Exp. Hematol., 17:1122-1127 (1988); Mazur et al., Exp. Hematol., 13:1164 (1985); Mazur et al., J. Clin. Invest., 68:733-741 (1981); Sheiner et al., Blood, 56:183-188 (1980); Hill et al., Exp. Hematol., 20:354-360 (1992); og Hegyi et al., Int. J. Cell Cloning, 8:236-244 (1990)). Disse aktivitetene ble rapportert å være linjespesifikke og forskjellige fra kjente cytokiner (Hill, R.J. et al., Blood, 80:346 (1992); Erickson-Miller, C.L. et al., Brit. J. Haematol., 84:197-203 (1993); Straneva, J.E. et al., Exp. Hematol., 20:4750 (1992); og Tsukada, J. et al., Blood, 81:866-867 (1993)). Hittil har forsøk på å rense meg-CSF eller trombopoietin fra trombocytopenisk plasma eller urin ikke vært vellykket.

I overensstemmelse med observasjonene ovenfor som

beskriver trombocytopenisk plasma, har vi funnet at aplastisk, porcint plasma (APP) erholdt fra bestrålte griser, stimulerer human megakaryocytopoese *in vitro*. Vi har funnet at denne stimulatoraktiviteten oppheves av det oppløselige, ekstracellulære domene i *c-mpl*, noe som bekrefter APP som en potensiell kilde for den putative *mpl*-ligand (ML). Vi har nå med hell renset *mpl*-liganden fra APP, og aminosyresekvensinformasjon ble brukt til å isolere murin, porcin og human ML-cDNA. Disse ML-ene har sekvenshomologi med erytropoietin og har både meg-

10 CSF- og trombopoietinlignende aktiviteter.

1. Rensing og identifikasjon av *mpl*-ligand fra plasma

Som angitt ovenfor, er aplastisk plasma fra mange forskjellige arter blitt rapportert å inneholde aktiviteter som stimulerer hematopoese *in vitro*, det har imidlertid tidligere ikke blitt rapportert isolert noen hematopoesestimulatortfaktor fra plasma. Én kilde for aplastisk plasma er den som oppnås fra bestrålte griser. Dette aplastiske, porcine plasma (APP) stimulerer humanhematopoese *in vitro*. For å bestemme om APP inneholder *mpl*-liganden, ble dens effekt analysert ved å måle ³H-tymidininkorporering i Ba/F3-celler transfektert med human-*mpl*-P (Ba/F3-*mpl*) ved hjelp av fremgangsmåten vist i figur 2. APP stimulerte ³H-tymidininkorporering i Ba/F3-*mpl*-celler, men ikke Ba/F3-kontrollceller (dvs. ikke transfektert med human-*mpl*-P). I tillegg ble det ikke observert noen slik aktivitet i normalt, porcint plasma. Disse resultatene indikerte at APP inneholdt en faktor eller faktorer som omdannet et proliferativt signal gjennom *mpl*-reseptoren og derfor ville kunne være den naturlige ligand for denne reseptoren. Dette ble ytterligere understøttet av det funn at behandling av APP med oppløselig *mpl*-IgG blokkerte stimulatoreffektene av APP på Ba/F3-*mpl*-celler.

25 30

Aktiviteten i APP syntes å være et protein ettersom pronase, DTT eller varme ødelegger aktiviteten i APP (figur 3). Aktiviteten var også ikke-dialyserbar. Aktiviteten var imidlertid stabil overfor lav pH (pH 2,5 i 2 timer) og ble påvist å binde og eluere fra flere lektinaffinitetskolonner, noe som indikerer at den var et glykoprotein. For ytterligere

35

å belyse strukturen og identiteten til denne aktiviteten, ble den affinitetsrenset fra APP under anvendelse av en *mpl*-IgG-kimære.

APP ble behandlet i henhold til fremgangsmåten angitt i eksemplene 1 og 2. I korte trekk ble *mpl*-liganden renset under anvendelse av hydrofob interaksjonskromatografi (HIC), immobilisert fargestoffkromatografi og *mpl*-affinitetskromatografi. Utvinningen av aktiviteten fra hvert trinn er vist i figur 4, og antall ganger rensing er gitt i tabell 1. Den totale utvinning av aktivitet gjennom *mpl*-affinitetskolonnen var omtrent 10%. Toppaktivitetsfraksjonen (F6) fra *mpl*-affinitetskolonnen har en beregnet, spesifikk aktivitet på $9,8 \times 10^6$ enheter/mg. Den totale rensing fra 5 liter APP var omtrent 4×10^6 ganger (0,8 enheter/mg til $3,3 \times 10^6$ enheter/mg) med en 83×10^6 gangers reduksjon i protein (250 g til 3 μ g). Vi beregnet den spesifikke aktivitet av liganden eluert fra *mpl*-affinitetskolonnen til å være ca. 3×10^6 enheter/mg.

Tabell 1
Rensing av *mpl*-ligand

Prøve	Volum ml	Protein mg/ml	Enheter/ ml	Enheter	Spesifikk aktivitet enheter/ml	Ut- bytte %	Gangers rensing
APP	5000	50	40	200 000	0,8	-	1
Fenyl	4700	0,8	40	200 000	50	94	62
"Blue-Sep."	640	0,93	400	256 000	430	128	538
<i>mpl</i> (μ l) Fraksj. 5-7)	12	5×10^{-4}	1666	20 000	3 300 000	10	4 100 000

Protein ble bestemt ved hjelp av Bradford-analysen. Protein-konsentrasjon av *mpl*-eluerte fraksjoner 5-7 beregnes basert på fargestyrke til en sølvfarget SDS-gel. En enhet er definert som det som forårsaker 50% maksimal stimulering av Ba/F3-*mpl*-

celleproliferasjon.

Analyse av eluerte fraksjoner fra *mpl*-affinitetskøl-
onnen ved å anvende SDS-PAGE (4-20%, "Novex"-gel) under redus-
erende betingelser, avslørte tilstedeværelsen av flere pro-
teiner (figur 5). Proteiner som sølvfarget med den største
styrken, oppløste med tilsynelatende Mr på 66 000, 55 000,
30 000, 28 000 og 18 000-22 000. For å bestemme hvilke av
disse proteinene som stimulerte proliferasjon av Ba/F3-*mpl*-
cellekulturer, ble proteinene eluert fra gelen som beskrevet i
eksempel 2.

Resultatene av dette forsøket viste at mesteparten av
aktiviteten eluerte fra et gelstykke som omfattet proteiner
med Mr 28 000-32 000, idet mindre aktivitet eluerte i området
18 000-22 000 i gelen (figur 6). De eneste proteinene som var
synlige i disse områdene, hadde Mr på 30 000, 28 000 og
18 000-22 000. For å identifisere og erholde proteinsekvens
for proteinene som oppløstes i dette område av gelen (dvs.
båndene 30, 28 og 18-22 kDa), ble disse tre proteinene elek-
troblottet til PVDF og sekvensert som beskrevet i eksempel 3.
Oppnådde aminoendesequenser er gitt i tabell 2.

Tabell 2

Mpl-ligand-aminoendesequenser

30 kDa	
1 5 10 15 20 25	
(S) P A P P A (C) D P R L L N K L L R D D (H/S) V L H (G) R L	(SEKV. ID NR. 30)
28 kDa	
1 5 10 15 20 25	
(S) P A P P A X D P R L L N K L L R D D (H) V L (H) G R	(SEKV. ID NR. 31)
18-22 kDa	
1 5 10	
X P A P P A X D P R L X (N) (K)	(SEKV. ID NR. 32)

Datamaskinassistert analyse avslørte at disse aminosyresekvensene var nye. Ettersom alle tre sekvensene var de samme, ble det antatt at 30 kDa-, 28 kDa- og 18-22 kDa-proteinene var beslektet og vil kunne være forskjellige former av et samme nye protein. Dessuten var dette eller disse proteinene en sannsynlig kandidat som den naturlige *mpl*-ligand ettersom aktiviteten oppløste på SDS-PAGE i det samme område (28 000-32 000) i en 4-20% gel. I tillegg migrerte den delvis rensede ligand med en M_r på 17 000-30 000 når den ble underkastet gelfiltreringskromatografi under anvendelse av en "Superose 12"- (Pharmacia) kolonne. Det antas at de forskjellige M_r -formene til liganden er et resultat av proteolyse eller glykosyleringsforskjeller eller andre etter- eller førtranslasjonelle modifikasjoner.

Som tidligere beskrevet, motvirket antisense-human-*mpl*-RNA megakaryocytopoese i humane benmargskulturer anrikt med CD 34⁺-forløperceller uten å påvirke differensieringen av andre hematopoeseceellelinjer (Methia et al., *supra*). Dette resultatet tyder på at *mpl*-reseptoren ville kunne spille en rolle ved differensieringen og proliferasjonen av megakaryocyttter *in vitro*. For ytterligere å belyse rollen til *mpl*-liganden i megakaryocytopoese ble effektene av APP og det *mpl*-ligandfattige APP på human megakaryocytopoese *in vitro* sammenlignet. Effekten av APP på human megakaryocytopoese ble bestemt ved å bruke en modifikasjon av væskesuspensjonsmegakaryocytopoeseanalysen beskrevet i eksempel 4. Ved denne analysen ble humane, perifere stamceller (PSC) behandlet med APP før og etter *mpl*-IgG-affinitetskromatografi. GPIIbIIIa-stimulering av megakaryocytopoese ble kvantifisert med ¹²⁵I-anti-IIbIIIa-antistoff (figur 7). Som vist i figur 7, forårsaket 10% APP omtrent en tre ganger stimulering, mens APP som er fattig på *mpl*-ligand, ikke hadde noen effekt. Bemerkesverdig nok induerte det *mpl*-ligandfattige APP ikke proliferasjon av Ba/F3-*mpl*-celler.

Ved et annet forsøk nøytraliserte oppløselig human-*mpl*-IgG tilsatt på dagene 0, 2 og 4 til kulturer som inneholdt 10% APP, stimulatoreffektene av APP på human megakaryocyto-

poese (figur 8). Disse resultatene indikerer at *mpl*-liganden spiller en rolle ved regulering av human megakaryocytopoese og derfor kan være anvendbar til behandlingen av trombocytopeni.

5 2.Molekylær kloning av *mpl*-liganden

Basert på den aminoternale aminosyresekvens erholdt fra 30 kDa-, 28 kDa- og 18-22 kDa-proteinene (se tabell 2 ovenfor), ble det utformet to degenererte oligonukleotid-primerblandinger som ble brukt til å amplifisere porcin, gen-
 10 omisk DNA ved hjelp av PCR. Det ble resonnert med at dersom den aminoternale aminosyresekvens ble kodet for av et enkelt exon, var det korrekte PCR-produkt forventet å være 69 bp langt. Et DNA-fragment med denne størrelsen ble funnet og underklonet i pGEMT. Sekvensene til oligonukleotid-PCR-
 15 primerne og de tre klonene som ble oppnådd, er vist i eksempel 5. Aminosyresekvensen (PRLNKLRLR (SEKV. ID NR. 33)) til peptidet som kodes for mellom PCR-primerne, var identisk med det som ble oppnådd ved hjelp av aminoterminal proteinsekvensering av den porcine ligand (se restene 9-17 for 28 og 30 kDa-porcineproteinsekvensene ovenfor).
 20

Et syntetisk oligonukleotid basert på sekvensen til PCR-fragmentet, ble brukt til å screene et humant genom-DNA-bibliotek. Et 45-mert oligonukleotid, betegnet pR45, ble utformet og syntetisert basert på sekvensen til PCR-fragmentet.
 25 Dette oligonukleotidet hadde den følgende sekvens:

30 5' GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCG 3'

(SEKV. ID NR. 34)

35 Dette deoksyoligonukleotid ble brukt til å screene et humant genom-bibliotek i λ gem12 under lite strenge hybridiserings- og vaskebetingelser i henhold til eksempel 6. Positive kloner ble plukket ut, plakk rensset og analysert ved hjelp av

restriksjonskartlegging og "southern blotting". Et 390 bp stort EcoRI-XbaI-fragment som hybridiserte til 45-meren, ble underklonet i "pBluescript SK-". DNA-sekvensering av denne klon bekreftet at DNA som koder for humanhomologen av den porcine *mpl*-ligand, var blitt isolert. Human-DNA-sekvensen og utledet aminosyresekvens er vist i fig. 9 (SEKV. ID NR. 3 & 4). De forutsagte stillinger til introner i genomsekvensen er også angitt ved hjelp av piler og definerer et putativt exon ("exon 3").

Basert på den humane "exon 3"-sekvens (eksempel 6), ble det syntetisert oligonukleotider som tilsvarer 3'- og 5'-endene til exonsekvensen. Disse to primerne ble brukt i PCR-reaksjoner som gjør bruk av en templat-cDNA-fremstilt fra forskjellige humanvev. Den forventede størrelse til det korrekte PCR-produkt var 140 bp. Etter analyse av PCR-produktene på en 12% polyakrylamidgel ble det påvist et DNA-fragment med den forventede størrelse i cDNA-biblioteker fremstilt fra human-nyre fra voksent individ, 293 fosternyreceller og cDNA fremstilt fra human fosterlever.

Et fosterlever-cDNA-bibliotek (7×10^6 kloner) i lambda DR2 ble deretter screenet med det samme 45-mere oligonukleotid brukt til å screene human-genombiblioteket og fosterlever-cDNA-biblioteket under lite strenge hybridiseringsbetingelser. Positive kloner ble plukket ut, plakk renses og innføyelsesstørrelsen bestemt ved hjelp av PCR. En klon med en 1,8 kb stor innføyelse ble valgt ut for videre analyse. Ved å bruke fremgangsmåten beskrevet i eksempel 7, ble nukleotid- og den utledede aminosyresekvens for human-*mpl*-liganden (hML) oppnådd. Disse sekvensene er vist i fig. 1 (SEKV. ID NR. 1 & 2).

3. Struktur til human-*mpl*-liganden (hML)

cDNA-sekvensen for human-*mpl*-ligand (hML) (fig. 1 (SEKV. ID NR. 2)) omfatter 1 774 nukleotider etterfulgt av en poly(A)-hale. Den inneholder 215 nukleotider i 5'-uttranslatert sekvens og et 3'-uttranslatert område med 498 nukleotider. Det antatte initieringskodon i nukleotidstilling (216-218) er innenfor en konsensussekvens som er gunstig for eukaryot

translasjonsinitiering. Den åpne leseramme er 1 059 nukleotider lang og koder for et 353 aminosyreresters polypeptid som begynner i nukleotidstilling 220. N-enden til den forutsagte aminosyresekvens er svært hydrofob og tilsvarer sannsynligvis et signalpeptid. Datamaskinanalyse av den forutsagte aminosyresekvens (von Heijne et al., Eur. J. Biochem., 133:17-21 (1983)) indikerer et potensielt spaltingssete for signalpeptidase mellom restene 21 og 22. Spalting i denne stillingen ville frembringe et modent polypeptid med 332 aminosyrerester som begynner med den aminoterminal sekvens erholdt fra *mpl*-ligand rensset fra porcint plasma. Den forutsagte, ikke-glykosylerte molekylvekt til liganden med 332 aminosyrerester er ca. 38 kDa. Det er 6 potensielle N-glykosyleringsseter og 4 cysteinrester.

Sammenligning av *mpl*-ligandsekvensen med "Genbank"-sekvensdatabasen avslørte 23% identitet mellom de aminoterminal 153 rester i moden human-*mpl*-ligand og humanerytropoietin (fig. 10 (SEKV. ID NR. 6 & 7)). Når konservative substitusjoner tas i betraktning, oppviser dette området i hML 50% likhet med humanerytropoietin (hEPO). Både hEPO og hML inneholder fire cysteiner. Tre av de fire cysteinene er konserververt i hML, inkludert det første og det siste cystein. Forsøk med seterettet mutagenese har vist at det første og siste cystein i erytropoietin danner en disulfidbinding som er påkrevet for virkning (Wang, F.F. et al., Endocrinology, 116:2286-2292 (1983)). Analogt kan det første og siste cystein i hML også danne en avgjørende disulfidbinding. Ingen av glykosyleringssetene er konserververt i hML. Alle potensielle, hML-N-bundne glykosyleringsseter er lokalisert i den karboksyterminale halvdelen av hML-peptidet.

På lignende måte som med hEPO, inneholder hML-mRNA-en ikke konsensuspolyadenyleringssekvensen AAUAAA, og heller ikke regulelementet AUUUA som er til stede i 3'-utranslaterte områder i mange cytokiner, og som man mener påvirker mRNA-stabilitet (Shaw et al., Cell, 46:659-667 (1986)). "Northern blot"-analyse avslører lave nivåer av et enkelt 1,8 kb hML-RNA-transkript i både foster- og voksenlever. Etter lang eksponering kunne et svakere bånd med den samme størrelse påvises

i voksenalder. Ved sammenligning uttrykkes humanerytropoietin i fosterlever og, som svar på hypoksi, i voksenalderen og leveren (Jacobs et al., *Nature*, 313:804-809 (1985) og Bondurant et al., *Molec. Cell. Biol.*, 6:2731-2733 (1986)).

5 Viktigheten av det C-terminale område i hML gjenstår å bli belyst. Basert på tilstedeværelsen av de seks potensielle setene for N-bundet glykosylering og evnen til liganden når det gjelder å binde lektinaffinitetsskolonner, er dette området i hML sannsynligvis glykosylert. I noen geleluerings-
10 forsøk observerte vi aktivitet som oppløstes ved en Mr rundt 60 000, som kan representere det glykosylerte fullengdemolekyl. Det C-terminale område kan derfor virke til å stabilisere og øke halveringstiden til hML i omløp. I tilfellet med erytropoietin har den ikke-glykosylerte form full biologisk
15 aktivitet *in vitro*, men har en signifikant redusert plasmahalveringstid i forhold til glykosylert erytropoietin (Takeuchi et al., *J. Biol. Chem.*, 265:12127-12130 (1990); Narhi et al., *J. Biol. Chem.*, 266:23022-23026 (1991) og Spivack et al., *Blood*, 7:90-99 (1989)). Det C-terminale domene i hML inne-
20 holder to tobasiske aminosyresekvenser (Arg-Arg-motiver i stillingene 153-154 og 245-246) som kunne tjene som potensielle prosesseringssteder. Spalting av disse setene kan være ansvarlig for generering av 30, 28 og 18-22 kDA-formene av ML isolert fra APP. Bemerkelsesverdig nok opptrer Arg₁₅₃-Arg₁₅₄-
25 sekvensen umiddelbart etter det erytropoietinlignende domene i ML. Disse observasjonene indikerer at fullengde-ML kan utgjøre et forløperprotein som gjennomgår begrenset proteolyse for å frembringe den modne ligand.

30 4. Isoformer og varianter av human-mpl-liganden

Isoformer eller alternativt spleisede former av human-mpl-ligand ble påvist ved hjelp av PCR i human voksenlever. I korte trekk ble det syntetisert primere som tilsvarende hver ende samt utvalgte, indre områder i den kodende sekvens
35 for hML. Disse primerne ble brukt i RT-PCR for å amplifisere human voksenlever-RNA som beskrevet i eksempel 10. I tillegg til fullengdeformen, betegnet hML, ble det observert eller utledet tre andre former, betegnet hML2, hML3 og hML4. De

modne, utledede aminosyresekvensene til alle fire isoformene er vist i fig. 11 (SEKV. ID NR. 6, 8, 9 & 10). hML3 har en 116 nukleotiders delesjon i 700-stilling som resulterer i både en aminosyredelesjon og et rammeskift. cDNA-en koder nå for et modent polypeptid som er 265 aminosyrer langt og atskiller seg fra hML-sekvensen i aminosyrerest 139. Endelig har hML4 både en 12-nukleotiders delesjon etter nukleotidstilling 618 (også funnet i muse- og grisesekvensene (se nedenunder)) og den 116 bp store delesjon som finnes i hML3. Selv om det ikke er blitt isolert noen kloner med bare den 12 bp store delesjon (etter nukleotid 619) i humanformen (betegnet hML2), foreligger denne formen sannsynligvis fordi en slik isoform er blitt identifisert i både muse- og griseformen (se nedenunder), og fordi den er blitt identifisert i sammenheng med den 116 store nukleotiddelesjonen i hML4.

Både en substitusjonsvariant av hML hvor den tobasiske Arg₁₅₃-Arg₁₅₄-sekvensen er blitt erstattet med to alaninrester og en "EPO-domene"-avkortet form av hML ble konstruert for å bestemme hvorvidt fullengde-ML var nødvendig for biologisk aktivitet. Den Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ tobasiske sekvenssubstitusjonsvariant henvist til som hML(R153A, R154A), ble konstruert ved å anvende PCR som beskrevet i eksempel 10. Den "EPO-domene"-avkortede form, hML₁₅₃, ble også laget ved å anvende PCR ved å innføre et stoppkodon etter Arg153.

25

5. Ekspresjon av rekombinant human-*mpl*-ligand (rhML) i transient transfekterte humanembryonyceller (293)

For å bekrefte at den klonede human-cDNA kodet for en ligand for *mpl*, ble liganden uttrykt i pattedyr-293-celler under kontroll av den umiddelbart tidlige cytomegaloviruspromoter under anvendelse av ekspresjonsvektorene pRK5-hML eller pRK5-hML₁₅₃. Supernatanter fra transient transfekterte, humane embryonyceller ble funnet å stimulere ³H-tymidininkorporering i Ba/F3-*mpl*-celler, men ikke i Ba/F3-opphavsceller (fig. 12A). Medier fra 293-cellene transfektert med pRK-vektoren alene, inneholdt ikke denne aktivitet. Tilsetning av *mpl*-IgG til mediene opphevet stimuleringen (data ikke vist). Disse resultater viser at den klonede cDNA koder for en funk-

35

sjonell, human ML (hML).

For å bestemme om "EPO-domenet" alene kunne binde og aktivere *mpl*, ble den avkortede form av hML, rhML₁₅₃, uttrykt i 293-celler. Supernatanter fra transfekterte celler ble funnet
 5 å ha lignende aktivitet som den som er til stede i supernatanter fra celler som uttrykker fullengde-hML (fig. 12A), noe som indikerer at det C-terminale domene i ML ikke er påkrevet for binding og aktivering av *c-mpl*.

10 6. *Mpl*-ligand stimulerer megakaryocytopoese og trombopoese

Både fullengde-rhML- og den avkortede rhML₁₅₃-formen av rekombinant hML stimulerte human megakaryocytopoese *in vitro* (fig. 12B). Denne effekten ble observert i fravær av andre eksogent tilsatte hematopoesevekstfaktorer. Med unntak
 15 av IL-3 var ML den eneste hematopoesevekstfaktor testet som utviste denne aktiviteten. IL-11, IL-6, IL-1, erytropoietin, G-CSF, IL-9, LIF, sett-ligand (KL), M-CSF, OSM og GM-CSF hadde ingen effekt på megakaryocytopoese når de ble testet separat i vår analyse (data ikke vist). Dette resultatet viser at ML har
 20 megakaryocytstimulerende aktivitet og indikerer en rolle for ML ved regulering av megakaryocytopoese.

Trombopoeseaktiviteter som er til stede i plasma hos trombocytopeniske dyr, er blitt påvist å stimulere blodplateproduksjon i en museanalyse med gjenbundet trombocytose
 25 (McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14:1006-1001 (1973) og McDonald et al., Scand. J. Haematol., 16:326-334 (1976)). I denne modellen gjøres mus akutt trombocytopeniske under anvendelse av bestemt antiblodplateserum, noe som resulterer i en forutsigbar, gjenbundet trombocytose. Slike immunotrombocytopeniske mus gir mer respons på eksogene, trombopoietinlignende
 30 aktiviteter enn det normale mus gjør (McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14:1006-1001 (1973)), akkurat som det at eksperimentelle mus er mer følsomme overfor erytropoietin enn det normale mus er (McDonald et al., J. Lab. Clin. Med., 77:134-
 35 143 (1971)). For å bestemme hvorvidt rML stimulerer blodplateproduksjon *in vivo*, ble mus i gjenbundet trombocytose injisert med delvis rensset rhML. Blodplateantall og inkorporering av ³⁵S i blodplater ble så kvantifisert. Injeksjon av mus med 64 000

eller 32 000 enheter rML økte blodplateproduksjon signifikant, slik det ble bevist ved hjelp av en ca. 20% økning i blodplateantall (henholdsvis $p=0,0005$ og $0,0001$) og en ca. 40% økning i ^{35}S -inkorporering i blodplater ($p=0,003$) hos de behandlede mus versus kontrollmus injisert med eksipiens alene (fig. 12C). Dette stimuleringsnivå er sammenlignbart med det som vi har observert med IL-6 i denne modell (data ikke vist). Behandling med 16 000 enheter rML stimulerte ikke blodplateproduksjon signifikant. Disse resultatene indikerer at ML stimulerer blodplateproduksjon på en doseavhengig måte og har derfor trombopoietinlignende aktivitet.

293-celler ble også transfektert med de øvrige hML-isoformkonstruksjonene beskrevet ovenfor, og supernatantene ble analysert ved å anvende Ba/F3-*mpl*-proliferasjonsanalysen (se fig. 13). hML2 og hML3 oppviste ingen påvisbar aktivitet i denne analysen, aktiviteten til hML(R153A, R154A) var imidlertid lignende med hML og hML₁₅₃, noe som indikerer at prosessering i det Arg₁₅₃-Arg₁₅₄-tobasiske sete hverken er påkrevet eller skadelig for aktivitet.

7. Megakaryocytopoese og *mpl*-liganden

Det er blitt foreslått at megakaryocytopoese reguleres på flere cellulære nivåer (Williams et al., J. Cell Physiol., 110:101-104 (1982) og Williams et al., Blood Cells, 15:123-133 (1989)). Dette er stort sett basert på den observasjon at visse hematopoesevekstfaktorer stimulerer proliferasjon av megakaryocytforløpere, mens andre synes primært å påvirke modning. Resultatene presentert her, tyder på at ML virker både som en proliferasjons- og modningsfaktor. At ML stimulerer proliferasjon av megakaryocytforløpere, understøttes av flere bevislinjer. For det første stimulerer APP både proliferasjon og modning av humanmegakaryocytter *in vitro*, og denne stimuleringen inhiberes fullstendig av *mpl*-IgG (fig. 7 og 8). Inhiberingen av megakaryocyttkolonidannelse ved hjelp av *c-mpl*-antisense-oligonukleotider (Methia et al., Blood, 82:1395-1401 (1993)) og det funn at *c-mpl* kan omdanne et proliferasjonssignal i celler som det er transfektert i (Skoda et al., EMBO, 12:2645-2653 (1993) og Vigon et al., Oncogene,

8:2607-2615 (1993)), indikerer dessuten også at ML stimulerer proliferasjon. Den tydelige ekspresjon av *c-mpl* under alle stadier av megakaryocyttendifferensiering (Methia et al., Blood, 82:1395-1401 (1993)) og evnen til rekombinant ML til hurtig å stimulere blodplateproduksjon *in vivo*, indikerer at ML også påvirker modning. Tilgjengeligheten av rekombinant ML muliggjør en forsiktig evaluering av dens rolle ved regulering av megakaryocytopoese og trombopoese, samt dens potensial for å påvirke andre hematopoeselinjer.

10 8. Isolering av human-*mpl*-ligandgenet (TPO-genet)

Humangenom-DNA-kloner av TPO-genet ble isolert ved hjelp av et humant genombibliotek i λ -Gem12 med pR45, under lite strenge betingelser eller under svært strenge betingelser med et fragment som tilsvarende 3'-halvparten av human-cDNA som koder for *mpl*-liganden. To overlappende lambdakloner som spenner over 35 kb, ble isolert. To overlappende fragmenter (BamHI og EcoRI) inneholdende hele TPO-genet, ble subklonet og sekvensert (se figurene 14A, 14B og 14C).

Strukturen til humangenet er sammensatt av 6 exoner innenfor 7 kb genom-DNA. Grænsene mellom alle exon- og intron-sammenknytningspunkter er i overensstemmelse med konsensus-motivet etablert for pattedyrgener (Shapiro, M.B. et al., Nucl. Acids Res., 15:7155 (1987)). Exon 1 og exon 2 inneholder 5'-utranslatert sekvens og de første fire aminosyrene i signalpeptidet. Det gjenværende av sekresjonssignalet og de første 26 aminosyrene i det modne protein kodes for i exon 3. Hele karboksylgruppen og de 3'-utranslaterte samt ca. 50 aminosyrer i det erythropoietinlignende domene kodes for i exon 6. De fire aminosyrene som er involvert i delesjonen observerert i hML-2 (hTPO-2), kodes for i 5'-enden av exon 6.

Analyse av humangenom-DNA ved hjelp av "Southern blot" indikerte at genet for TPO er til stede i en enkeltkopi. Den kromosomale lokalisering av genet ble bestemt ved hjelp av fluorescerende hybridisering (FISH) *in situ* som kartla det til kromosom 3q27-28.

9. Ekspresjon og rensing av TPO fra 293-celler

Fremstilling og rensing av ML eller TPO fra 293-

celler er beskrevet nærmere i eksempel 19. I korte trekk ble det erholdt cDNA som tilsvarer hele den åpne TPO-leseramme, ved hjelp av PCR under anvendelse av pRK5-hmpl I. PCR-produktet ble renset og klonet mellom restriksjonssetene ClaI og
 5 XbaI i plasmidet pRK5tkneo (en pRK5-avledet vektor modifisert til å uttrykke et neomycinresistensgen under kontroll av tymidinkinasepromoter), hvorved man fikk vektoren pRK5tkneo.ORF (en vektor som koder for hele den åpne leseramme).

En andre vektor som koder for det EPO-homologe
 10 domene, ble frembrakt på samme måte, men ved å anvende andre PCR-primere, hvorved man fikk sluttkonstruksjonen kalt pRK5tkneoEPO-D.

Disse to konstruksjonene ble transfektert i human-embryonyreceller ved hjelp av CaPO₄-metoden, og neomycinresistente kloner ble valgt ut og fikk vokse til sammenflytning. Ekspresjon av ML₁₅₃ eller ML₃₃₂ i de kondisjonerte medier fra disse klonene ble fastlagt ved å bruke Ba/F3-*mpl*-proliferasjonanalysen.

Rensing av rhML₃₃₂ ble utført som beskrevet i eksempel
 20 19. I korte trekk ble 293-rhML₃₃₂-kondisjonert medium anvendt på en kolonne med "Blue-Sepharose" (Pharmacia) som deretter ble vasket med en buffer inneholdende 2 M urea. Kolonnen ble eluert med en buffer inneholdende 2 M urea og 1 M NaCl. "Blue-Sepharose"-elueringsblandingen ble så anvendt direkte på en
 25 "WGA-Sepharose"-kolonne, vasket med 10 kolonnevolumer buffer inneholdende 2 M urea og 1 M NaCl og eluert med den samme buffer inneholdende 0,5 M N-acetyl-D-glukosamin. "WGA-Sepharose"-eluatet ble anvendt på en C4-HPLC-kolonne (Synchrom, Inc.) og eluert med en diskontinuerlig propanolgradient. Ved hjelp av
 30 SDS-PAGE migrerer den rensede 293-rhML₃₃₂ som et bredt bånd i 68-80 kDa-området i gelen (se fig. 15).

Rensing av rhML₁₅₃ ble også utført som beskrevet i eksempel 19. I korte trekk ble 293-rhML₁₅₃-kondisjonert medium oppløst på "Blue-Sepharose" som beskrevet for rhML₃₃₂. "Blue-
 35 Sepharose"-eluatet ble anvendt direkte på en *mpl*-affinitetskolonne som beskrevet ovenfor. RhML₁₅₃ eluert fra *mpl*-affinitetskolonnen, ble renset til homogenitet ved å bruke en C4-

HPLC-kolonne kjørt under de samme betingelser som ble brukt for rhML₃₃₂. Ved hjelp av SDS-PAGE oppløses den rensede rhML₁₅₃ i to hovedbånd og to mindre bånd med Mr på ca. 18 000-22 000 (se fig. 15).

5

10. Murin-mpl-liganden

Et DNA-fragment som tilsvarende det kodende område i human-mpl-liganden, ble erholdt ved hjelp av PCR, gelrenset og merket i nærvær av ³²P-dATP og ³²P-dCTP. Denne proben ble brukt til å screene 10⁶ kloner i et muselever-cDNA-bibliotek i λGT10. En murin klón (fig. 16 (SEKV. ID NR. 12 & 13)) inneholdende en 1 443 basepar stor innføyelse, ble isolert og sekvensert. Det forutsagte initieringskodon i nukleotidstilling 138-141 var innenfor en konsensussekvens som var gunstig for eukaryot translasjonsinitiering (Kozak, M., J. Cell Biol., 108:229-241 (1989)). Denne sekvensen definerer en åpen leseramme på 1 056 nukleotider som forutsier et primært translasjonsprodukt med 352 aminosyrer. Det er 137 nukleotider i 5'- og 247 nukleotider i 3'-utranslatert sekvens som flankerer denne åpne leseramme. Det er ingen poly(A)-hale etter det 3'-utranslaterte område, noe som indikerer at klonen sannsynligvis ikke er fullstendig. N-enden i den forutsagte aminosyresekvens er svært hydrofob og utgjør sannsynligvis et signalpeptid. Datamaskinanalyse (von Heijne, G., Eur. J. Biochem., 133:17-21 (1983)) indikerte et potensielt spaltingssete for signalpeptidase mellom restene 21 og 22. Spalting i denne stillingen ville frembringe et modent polypeptid med 331 aminosyrer (35 kDa) identifisert som mML₃₃₁ (eller mML2 av grunner beskrevet nedenunder). Sekvensen inneholder 4 cysteiner, alle konserverte i humansekvensen, og 7 potensielle N-glykosyleringssteder, hvorav 5 er konserverte i humansekvensen. Som med hML, er igjen alle 7 potensielle N-glykosyleringssteder lokalisert i den C-terminale halvdel av proteinet.

35

Sammenlignet med den humane ML, ble det observert betydelig identitet både for nukleotid- og utledede aminosyresekvenser i "EPO-domenene" til disse ML-ene. Når utledede aminosyresekvenser for humane og muse-ML-er ble sammenstilt,

syntes imidlertid musesekvensen å ha en tetrapeptiddelesjon mellom restene 111 og 114 som tilsvarer 12-nukleotiddelesjonen etter nukleotidstilling 618 som ses både i den humane (se ovenfor) og grise- (se nedenunder) cDNA-en. Ytterligere kloner ble følgelig undersøkt for å påvise mulige murin-ML-isoformer. Én klon kodet for et 335 aminosyrers utledet sekvenspolypeptid som inneholder det "manglende" tetrapeptid LPLQ. Denne formen antas å være den murine fullengde-ML og henvises til som mML eller mML₃₃₅. Nukleotid- og den utledede aminosyresekvens for mML er angitt i fig. 17 (SEKV. ID NR. 14 & 15). Denne cDNA-klon består av 1 443 basepar etterfulgt av en poly(A)-hale. Den har en åpen leseramme på 1 068 bp flankert av 134 baser fra 5'- og 241 baser fra 3'-utranslatert sekvens. Det antatte initieringskodon ligger i nukleotidstilling 138-140. Den åpne leseramme koder for et forutsagt protein på 356 aminosyrer, hvorav de første 21 er svært hydrofobe og sannsynligvis virker som et sekresjonssignal.

Til sist ble en tredje murinklon isolert, sekvensert og funnet å inneholde 116-nukleotiddelesjonen som tilsvarer hML3. Denne murine isoformen betegnes derfor mML3. Sammenligning av de utledede aminosyresekvenser til disse to isoformene er vist i fig. 18 (SEKV. ID NR. 9 & 16).

Den totale aminosyresekvensidentitet mellom human- og muse-ML (fig. 19 (SEKV. ID NR. 6 & 17)) er 72%, men denne homologien er ikke jevnt fordelt. Området definert som "EPO-domenet" (aminosyrene 1-153 for humansekvensen og 1-149 for musesekvensen), er bedre konserverert (86% homologi) enn det karboksyterminale område av proteinet (62% homologi). Dette kan videre indikere at bare "EPO-domenet" er viktig for den biologiske aktivitet til proteinet. Interessant nok er av de to tobasiske aminosyremotivene som finnes i hML, bare det tobasiske motivet umiddelbart etter "EPO-domenet" (reststilling 153-154) i humansekvensen til stede i murinsekvensen. Dette er i overensstemmelse med den muligheten at fullengde-ML kan utgjøre et forløperprotein som gjennomgår begrenset proteolyse, hvorved den modne ligand frembringes. Alternativt kan proteolyse mellom Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ lette hML-klaring.

En ekspresjonsvektor som inneholder hele den kodende

sekvens til mML, ble transient transfektert i 293-celler som beskrevet i eksempel 1. Kondisjonert medium fra disse cellene stimulerte ^3H -tymidininkorporering i Ba/F3-celler som uttrykker enten murin- eller human-*mpl*, men hadde ingen effekt på opphavscellelinjen (*mpl*-manglende). Dette indikerer at den klonede murin-ML-cDNA koder for en funksjonell ligand som er i stand til å aktivere både murin- og human-ML-reseptoren (*mpl*).

11. Porcin-*mpl*-liganden

Porcin-ML (pML)-cDNA ble isolert ved hjelp av RACE-PCR som beskrevet i eksempel 13. Et PCR-cDNA-produkt med 1 342 bp ble funnet i nyre og subklonet. Flere kloner ble sekvensert og funnet å kode for en grise-*mpl*-ligand med 332 aminosyrerester henviset til som pML (eller pML₃₃₂) som har nukleotid- og den utledede aminosyresekvens vist i fig. 20 (SEKV. ID NR. 18 & 19).

Igjen ble det identifisert en andre form, betegnet pML2, som koder for et protein med en 4 aminosyreresters deleksjon (228 aminosyrerester) (se fig. 21 (SEKV. ID NR. 21)).

Sammenligning av pML- og pML2-aminosyresekvenser viser at den sistnevnte formen er identisk, bortsett fra at tetrapeptidet QLPP som tilsvare restene fra og med 111 til og med 114, er blitt delert (se fig. 22 (SEKV. ID NR. 18 & 21)). De fire aminosyredelesjonene observert i både murin- og porcin-ML-cDNA, opptrer i nøyaktig den samme stilling innenfor de forutsagte proteiner.

Sammenligning av de forutsagte aminosyresekvenser til den modne ML fra menneske, mus og gris (fig. 19 (SEKV. ID NR. 6, 17 & 18)) indikerer at total sekvensidentitet er 72% mellom mus og menneske, 68% mellom mus og gris, og 73% mellom gris og menneske. Homologien er vesentlig større i den aminoterminal halvdel av ML (EPO-homologt domene). Dette domenet er 80 til 84% identisk mellom hvilke som helst to arter, mens den karboksyterminale halvdel (karbohydratdomenet) bare er 57 til 67% identisk. Et tobasisk aminosyremotiv som kunne utgjøre et proteasespaltingssete, er til stede i karboksylenden til erythropoietinhomologidomenet. Dette motivet er konserververt mellom de tre artene i denne stillingen (fig. 19 (SEKV. ID NR. 6, 17 &

18)). Et andre tobasisk sete som er til stede i stilling 245 og 246 i humansekvensen, er ikke til stede i muse- eller grisesekvensene. Murin- og grise-ML-sekvensen inneholder 4 cysteiner, alle konserververt i humansekvensen. Det er 7 potensielle N-glykosyleringssteder i museliganden og 6 i den porcine ML, hvorav 5 er konserververt i humansekvensen. Igjen er alle de potensielle N-glykosyleringssetene lokalisert i den C-terminale halvdel av proteinet.

10 12.Ekspresjon og rensing av TPO fra ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO)

Ekspresjonsvektorene brukt til å transfektere CHO-celler, betegnes: pSVI5.ID.LL.MLORF (fullengde eller TPO₃₃₂) og pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (avkortet eller TPO₁₅₃). De relevante trekkene til disse plasmidene er vist i figurene 23 og 24.

Transfeksjonsfremgangsmåtene er beskrevet i eksempel 20. I korte trekk ble cDNA som tilsvarende hele den åpne lese-ramme til TPO, erholdt ved hjelp av PCR. PCR-produktet ble rensert og klonet mellom to restriksjonssteder (ClaI og SalI) i plasmidet pSVI5.ID.LL, hvorved man fikk vektoren pSVI5.ID.LL.MLORF. En andre konstruksjon tilsvarende det homologe EPO-domene, ble frembrakt på samme måte, men under anvendelse av en annen reversprimer (EPOD.Sal). Sluttkonstruksjonen for vektoren som koder for det homologe EPO-domene i TPO, kalles pSVI5.ID.LL.MLEPO-D.

Disse to konstruksjonene ble linearisert med NotI og transfektert i ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-DP12-celler, EP 307 247 publisert 15. mars 1989) ved hjelp av elektroporasjon. 10⁷ celler ble elektroporert i et BRL elektroporasjonsapparat (350 V, 330 mF, lav kapasitans) i nærvær av 10, 25 eller 50 mg DNA som beskrevet (Andreason, G.L., J.

Tissue Cult. Meth., 15, 56 (1993)). Dagen etter transfeksjonen ble cellene splittet i selektivt DHFR-medium (høyglukose DMEM-F12 50:50 uten glysin, 2 mM glutamin, 2-5% dialysert kalvefoster serum). 10 til 15 dager senere ble individuelle kolonier overført til 96-brønners plater og fikk vokse til sammenflytning. Ekspresjon av ML₁₅₃ eller ML₃₃₂ i det kondisjonerte medium

fra disse klonene ble fastlagt ved å bruke Ba/F3-*mpl*-proliferasjonsanalysen (beskrevet i eksempel 1).

Fremgangsmåten for rensing og isolering av TPO fra innhøstet CHO-cellekulturvæske er beskrevet i eksempel 20. I
5 korte trekk tilføres innhøstet cellekulturvæske (HCCF) til en "Blue Sepharose"-kolonne (Pharmacia) ved et forhold på omtrent 100 l HCCF pr. liter harpiks. Kolonnen vaskes så med 3 til 5 kolonnevolumer buffer etterfulgt av 3 til 5 kolonnevolumer av en buffer som inneholder 2,0 M urea. TPO elueres så med 3
10 til 5 kolonnevolumer buffer inneholdende både 2,0 M urea og 1,0 M NaCl.

"Blue Sepharose"-eluatblandingen inneholdende TPO, anvendes så på en "Wheat Germ Lectin Sepharose"-kolonne (Pharmacia) ekvilibrert i "Blue Sepharose"-elueringsbufferen
15 ved et forhold på 8 til 16 ml "Blue Sepharose"-eluat pr. ml harpiks. Kolonnen vaskes så med 2 til 3 kolonnevolumer ekvilibreringsbuffer. TPO elueres så med 2 til 5 kolonnevolumer av en buffer som inneholder 2,0 M urea og 0,5 M N-acetyl-D-glukosamin.

20 "Wheat Germ Lectin"-eluatet som inneholder TPO, surgjøres så, og $C_{12}E_8$ tilsettes inntil en sluttkonsentrasjon på 0,04%. Den resulterende blanding føres til en C4-reversfasekolonne ekvilibrert i 0,1% TFA, 0,04% $C_{12}E_8$ ved en påfylling på omtrent 0,2 til 0,5 mg protein pr. ml harpiks.

25 Proteinet elueres i en tofaselineærgradient av acetonitril inneholdende 0,1% TFA og 0,04% $C_{12}E_8$, og en blanding lages på grunnlag av SDS-PAGE.

C4-blandingen fortynnes så og diafiltreres mot omtrent 6 volumer buffer på en "Amicon YM" eller lignende ultra-
30 filtreringsmembran med en molekylvektgrense på 10 000 til 30 000 dalton. Det resulterende diafiltrat kan så bearbeides direkte eller konsentreres videre ved ultrafiltrering. Diafiltratet/konsentratet reguleres vanligvis til en sluttkonsentrasjon på 0,01% "Tween-80".

35 Alt eller en del av diafiltratet/konsentratet som er ekvivalent med 2-5% av det beregnede kolonnevolum, føres så til en "Sephacryl S-300 HR"-kolonne (Pharmacia) ekvilibrert i en buffer som inneholder 0,01% "Tween-80", og kromatograferes.

De TPO-holdige fraksjoner som er frie for aggregat og proteolytiske nedbrytningsprodukter, slås så sammen på grunnlag av SDS-PAGE. Den resulterende blanding filtreres og lagres ved 2-8 °C.

5

13.Fremgangsmåter for transformering og indusering av TPO-syntese i en mikroorganisme, og isolering, rensing og gjenfolding av TPO som lages i den

Konstruksjon av *E. coli* TPO-ekspresjonsvektorer er beskrevet nærmere i eksempel 21. I korte trekk ble plasmidene pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 og pMP202 alle utformet for å uttrykke de første 155 aminosyrene av TPO nedstrøms for en liten leder som varierer mellom de forskjellige konstruksjonene. Lederne sørger primært for høynivåtranslasjonsinitiering og hurtig rensing. Plasmidene pMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 er utformet for å uttrykke de første 153 aminosyrene i TPO nedstrøms for et initieringsmetionin og atskiller seg bare i kodonbruken for de første 6 aminosyrene i TPO, mens plasmidet pMP251 er et derivat av pMP210-1 hvor den karboksyterminale ende av TPO er forlenget ved hjelp av to aminosyrer. Alle de ovenfor nevnte plasmider vil gi høye nivåer av intracellulær ekspresjon av TPO i *E. coli* etter induksjon av tryptofanpromoterer (Yansura, D.G. et al., Methods in Enzymology (Goeddel, D.V., red.), 185:54-60, Academic Press, San Diego (1990)). Plasmidene pMP1 og pMP172 er mellomprodukter ved konstruksjonen av de ovenfor nevnte, intracellulære TPO-ekspresjonsplasmider.

De ovenfor nevnte TPO-ekspresjonsplasmider ble brukt til å transformere *E. coli* under anvendelse av CaCl_2 -varmesjokkmetoden (Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53:159-162 (1970)) og andre fremgangsmåter beskrevet i eksempel 21. I korte trekk ble de transformerte celler først dyrket ved 37 °C inntil kulturens optiske tetthet (600 nm) nådde omtrent 2-3. Kulturen ble så fortynnet og, etter dyrking med lufting, ble det tilsatt syre. Kulturen fikk så fortsette å vokse med lufting i ytterligere 15 timer, hvorefter cellene ble innhøstet ved sentrifugering.

Isolasjons-, rense- og gjenfoldingsfremgangsmåtene

som er angitt nedenunder for fremstilling av biologisk aktivt, gjenfoldet human-TPO eller fragmenter derav, er beskrevet i eksemplene 22 og 23, og kan anvendes for gjenvinning av hvilken som helst TPO-variant, inkludert N- og C-terminalt forlengede former. Andre fremgangsmåter egnet for gjenfolding av rekombinant eller syntetisk TPO, kan finnes i de følgende patenter: Builder et al., US patentskrift nr. 4 511 502; Jones et al., US patentskrift nr. 4 512 922; Olson, US patentskrift nr. 4 518 526 og Builder et al., US patentskrift nr. 4 620 948 som det henvises til for en generell beskrivelse av utvinnings- og gjenfoldingsfremgangsmåten for mange forskjellige, rekombinante proteiner uttrykt i en uoppløselig form i *E. coli*.

A.Utvinning av ikke-oppløselig TPO

En mikroorganisme, slik som *E. coli* som uttrykker TPO kodet for av hvilket som helst egnet plasmid, fermenteres under betingelser hvor TPO avsettes i uoppløselige, "refraktile legemer". Eventuelt vaskes celler først i en celleoppbrytningsbuffer. Vanligvis oppslemmes ca. 100 g celler på nytt i ca. 10 volumdeler av en celleoppbrytningsbuffer (f.eks. 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) med f.eks. et "Polytron" homogeniseringsapparat, og cellene sentrifugeres ved 5 000 x g i 30 minutter. Celler lyseres så under anvendelse av hvilken som helst vanlig teknikk, slik som tonisk sjokk, sonikering, trykksyklusbehandling, kjemiske eller enzymatiske metoder. For eksempel kan den vaskede cellepellet ovenfor på nytt oppslemmes i 10 volumdeler av en celleoppbrytningsbuffer med en homogenisator, og celleduspensjonen sendes gjennom en "LH Cell Disrupter" (LH Inceltech, Inc.) eller gjennom en "Microfluidizer" (Microfluidics International) i henhold til produsentens instruksjoner. Det partikkelformede materiale som inneholder TPO, separeres så fra væskefasen og vaskes eventuelt med en egnet væske. For eksempel kan en suspensjon av cellelysat sentrifugeres ved 5 000 x g i 30 minutter, på nytt oppslemmes og sentrifugeres en andre gang, hvorved det fås en vasket refraktillegemepellet. Den vaskede pellet kan brukes umiddelbart eller eventuelt lagres nedfrost (ved f.eks. -70 °C).

B. Oppløseliggjøring og rensing av monomer TPO

Uoppløselig TPO i refraktillegemepelleten oppløseliggjøres så med en oppløseliggjøringsbuffer. Oppløseliggjøringsbufferen inneholder et kaotropt middel og bufres vanligvis ved en basisk pH, og inneholder et reduksjonsmiddel for å forbedre utbyttet av monomer TPO. Representative, kaotrope midler omfatter urea, guanidin·HCl og natriumtiocyanat. Et foretrukket, kaotropt middel er guanidin·HCl. Konsentrasjonen av kaotropt middel er vanligvis 4-9 M, fortrinnsvis 6-8 M. pH-verdien i oppløseliggjøringsbufferen holdes ved hjelp av hvilken som helst egnet buffer i et pH-område fra ca. 7,5 til 9,5, fortrinnsvis 8,0-9,0, og mest foretrukket 8,0. Fortrinnsvis inneholder oppløseliggjøringsbufferen også et reduksjonsmiddel for å hjelpe til på dannelsen av den monomere form av TPO. Egnete reduksjonsmidler omfatter organiske forbindelser som inneholder en fri tiol (RSH). Representative reduksjonsmidler omfatter ditiotreitol (DTT), ditioerytritol (DTE), merkaptoetanol, glutathion (GSH), cysteamin og cystein. Et foretrukket reduksjonsmiddel er ditiotreitol (DTT). Eventuelt kan oppløseliggjøringsbufferen inneholde et svakt oksidasjonsmiddel (f.eks. molekyllært oksygen) og et sulfittsalt for dannelsen av monomer TPO via sulfitolyse. Ved denne utførelsesformen gjenfoldes det resulterende TPO-S-sulfonat senere i nærvær av redox-bufferen (f.eks. GSH/GSSG), hvorved det korrekte foldede TPO dannes.

TPO-proteinet renses vanligvis videre under anvendelse av f.eks. sentrifugering, gelfiltreringskromatografi og reversfasekolonnekromatografi.

Som illustrasjon har den følgende fremgangsmåte gitt egnede mengder av monomer TPO. Refraktillegemepelleten oppslemmes på nytt i ca. 5 vektvolumdeler av oppløseliggjøringsbufferen (20 mM Tris, pH 8, med 6-8 M guanidin og 25 mM DTT), og det omrøres i 1-3 timer eller over natten, ved 4 °C for å bevirke oppløseliggjøring av TPO-proteinet. Høye konsentrasjoner av urea (6-8 M) kan også anvendes, men generelt resulterer dette i noe lavere utbytter sammenlignet med guanidin. Etter oppløseliggjøring sentrifugeres oppløsningen ved 30 000 x g i 30 minutter, hvorved det fås en klar supernatant som

inneholder denaturert, monomert TPO-protein. Supernatanten kromatograferes så på en "Superdex 200"-gelfiltreringskolonne (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) ved en strømningshastighet på 2 ml/min., og proteinet elueres med 20 mM Na-fosfat, pH 6,0, med 10 mM DTT. Fraksjoner som inneholder monomert, denaturert TPO-protein som eluerer mellom 160 og 200 ml, slås sammen. TPO-proteinet renses ytterligere på en halvpreparativ C4-reversfasekolonne (2 x 20 cm, "Vydac"). Prøven påføres ved 5 ml/min. til en kolonne som er ekvilibrert i 0,1% TFA (tri-fluoreddiksyre) med 30% acetonitril. Proteinene elueres med en lineærgradient av acetonitril (30-60% i 60 minutter). Det rensede protein eluerer ved omtrent 50% acetonitril. Dette materiale brukes til gjenfolding, hvorved man får biologisk aktiv TPO-variant.

15

C. Gjenfolding av TPO for å frembringe den biologisk aktive form

Etter oppløseliggjøring og ytterligere rensing av TPO fås den biologisk aktive form ved gjenfolding av det denaturerte monomer-TPO i en redox-buffer. På grunn av den høye styrken til TPO (halvparten av maksimal stimulering i Ba/F3-analysen oppnås ved omtrent 3 pg/ml), er det mulig å oppnå biologisk aktivt materiale under utnyttelse av mange forskjellige buffer-, detergent- og redox-betingelser. Under de fleste betingelser oppnås det imidlertid bare en liten mengde korrekt foldet materiale (<10%). For kommersielle fremstillingsprosesser er det ønskelig å ha gjenfoldingsutbytter på minst 10%, mer foretrukket 30-50% og mest foretrukket >50%. Mange forskjellige detergenter, inkludert "Triton X-100", dodecyl-beta-maltosid, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkosyl, "Tween 20" og "Tween 80", "Zwittergent 3-14" og andre, ble funnet egnet for å fremstille i det minste noe korrekt foldet materiale. Blant disse var imidlertid de mest foretrukne detergenter de som tilhører CHAPS-familien (CHAPS og CHAPSO), som ble funnet å virke best i gjenfoldingsreaksjonen og å begrense proteinaggregasjon og ukorrekt disulfiddannelse. Nivåer av CHAPS som er høyere enn ca. 1%, var mest foretrukket. Natriumklorid var påkrevet for de beste utbyttene, idet de optimale nivåene

var mellom 0,1 M og 0,5 M. Tilstedeværelsen av EDTA (1-5 mM) i redox-bufferen var foretrukket for å begrense mengden av metallkatalysert oksidasjon (og aggregasjon) som ble observert ved noen fremstillinger. Glyserolkonsentrasjoner på mer enn 5 15% ga de optimale gjenfoldingsbetingelser. For maksimale utbytter var det avgjørende å ha et redox-par i redox-bufferen bestående av både en oksiderende og reduserende, organisk tiol (RSH). Egnede redox-par omfatter merkaptoetanol, glutathion (GSH), cysteamin, cystein og deres tilsvarende, oksiderte former. 10 Foretrukne redox-par var glutathion(GSH):oksidert glutathion(GSSG) eller cystein:cystin. Det mest foretrukne redox-par var glutathion(GSH):oksidert glutathion(GSSG). Generelt ble det observert høyere utbytter når molforholdet av oksidert medlem i redox-paret var likt eller over det reduserte medlem i 15 redox-paret. pH-verdier mellom 7,5 og ca. 9 var optimale for gjenfolding av disse TPO-varianter. Organiske oppløsningsmidler (f.eks. etanol, acetonitril, metanol) ble tolerert ved konsentrasjoner på 10-15% eller lavere. Høyere nivåer av organiske oppløsningsmidler økte mengden av ukorrekt foldede 20 former. Tris- og fosfatbufferer var generelt anvendbare. Inkubasjon ved 4 °C ga også høyere nivåer av korrekt foldet TPO.

Gjenfoldingsutbytter på 40-60% (basert på mengden av redusert og denaturert TPO anvendt ved gjenfoldingsreaksjonen) er vanlige for fremstillinger av TPO som er blitt rensset gjennom et første C4-trinn. Aktivt materiale kan oppnås med mindre 25 rene preparater (f.eks. direkte etter "Superdex 200"-kolonnen eller etter den innledende refraktilegimeekstraksjon) selv om utbytterne er lavere på grunn av omfattende utfelling og interferens av ikke-TPO-proteiner under TPO-gjenfoldingsprosessen.

30 Ettersom TPO inneholder 4 cysteinrester, er det mulig å frembringe tre forskjellige disulfidversjoner av dette proteinet:

versjon 1:disulfider mellom cysteinrestene 1-4 og 2-3

versjon 2:disulfider mellom cysteinrestene 1-2 og 3-4

35 versjon 3:disulfider mellom cysteinrestene 1-3 og 2-4.

Under den innledende undersøkelse for bestemmelse av gjenfoldingsbetingelser ble flere forskjellige toppler som

inneholder TPO-proteinet, separert ved hjelp av C4-reversfase-kromatografi. Bare én av disse toppene hadde betydelig biologisk aktivitet, slik det ble bestemt under anvendelse av Ba/F3-analysen. Deretter ble gjenfoldingsbetingelsene optimalisert, hvorved man fikk fortrinnsvis den versjonen. Under disse betingelsene var de feilfoldede versjoner mindre enn 10-20% av det totale monomer-TPO erholdt fra oppløseliggjøringstrinnet.

Disulfidmønsteret for det biologisk aktive TPO er blitt bestemt å være 1-4 og 2-3 ved hjelp av massespektrometri og proteinsekvensering, idet cysteinene er nummerert sekvensvis fra aminoenden. Dette cysteinkryssbindingsmønsteret er i overensstemmelse med det kjente disulfidbindingsmønster til det beslektede molekyl erytropoietin.

D. Biologisk aktivitet av rekombinant, gjenfoldet TPO

Gjenfoldet og rensed TPO har aktivitet ved analyser både *in vitro* og *in vivo*. For eksempel ble det ved Ba/F3-analysen oppnådd halvmaksimal stimulering av tymidininkorporering i Ba/F3-cellene for TPO (Met^{-1} 1-153) ved 3,3 pg/ml (0,3 pM). Ved den *mpl*-reseptorbaserte ELISA inntrådte halvmaksimal aktivitet ved 1,9 ng/ml (120 pM). Hos normale og myeloundertrykte dyr fremstilt ved hjelp av nær dødelig røntgenbestråling, var gjenfoldet TPO (Met^{-1} 1-153) svært sterk (aktivitet ble sett ved så lave doser som 30 ng/mus) når det gjelder å stimulere produksjonen av nye blodplater. Lignende biologisk aktivitet ble observert for andre former av TPO gjenfoldet i overensstemmelse med de ovenfor beskrevne fremgangsmåter (se figurene 25, 26 og 28).

14. Fremgangsmåter for måling av trombopoeseaktivitet

Trombopoeseaktivitet kan måles i forskjellige analyser, inkludert Ba/F3-*mpl*-ligandanalysen beskrevet i eksempel 1, museblodplategjenbindingssynteseanalyse *in vivo*, analyse av induksjon av blodplatecelleoverflateantigen som målt ved hjelp av en anti-blodplate-immunoanalyse (anti-GPII_bIII_a) for en humanleukemimegakaryoblastcellelinje (CMK) (se Sato et al., Brit. J. Haematol., 72:184-190 (1989)) (se også væskesuspensjonsmegakaryocytopoeseanalysen beskrevet i eksempel 4), og

induksjon av polyploidisering i en megakaryoblastcellelinje (DAMI) (se Ogura et al., Blood, 72(1):49-60 (1988)). Modning av megakaryocytter fra umodne, stort sett ikke-DNA-syntetiserende celler til morfologisk identifiserbare megakaryocytter omfatter en fremgangsmåte som inkluderer fremkomst av cytoplasmaorganeller, ervervelse av membranantigener (GPIIbIIIa), endoreplikasjon og frigjørelse av blodplater som beskrevet under teknikkens stand. En linjespesifikk promoter (dvs. *mpl*-liganden) for megakaryocytmodning ville forventes å indusere i det minste noen av disse endringene hos umodne megakaryocytter som fører til blodplatefrigjørelse og lindring av trombocytopeni. Det ble følgelig utformet analyser for å måle fremkomsten av disse parametrene hos umodne megakaryocytcellerlinjer, dvs. CMK- og DAMI-celler. CMK-analysen (eksempel 4) måler fremkomsten av en spesifikk blodplatemarkør, GPIIbIIIa, og blodplateavgivelse. DAMI-analysen (eksempel 15) måler endoreplikasjon ettersom økninger i ploidditet er kjennetegn på modne megakaryocytter. Gjenkjennelige megakaryocytter har ploidditetsverdier på 2 N, 4 N, 8 N, 16 N, 32 N etc. Endelig er museblodplategjenvinningsanalysen *in vivo* (eksempel 16) anvendbar ved påvisning av at administrering av testforbindelsen (her *mpl*-liganden) resulterer i økning av blodplateantall.

To ytterligere analyser *in vitro* er blitt utviklet for å måle TPO-aktivitet. Den første er en kinasereseptoraktiviserings-ELISA (KIRA-ELISA) hvor CHO-celler transfekteres med en *mpl*-Rse-kimære, og tyrosinfosforylering av Rse måles ved hjelp av ELISA etter eksponering av *mpl*-delen av kimæren mot *mpl*-ligand (se eksempel 17). Den andre er en reseptorbasert ELISA hvor ELISA-platebelagt kanin-anti-humant-IgG fanger opp humankimærreseptor-*mpl*-IgG som binder til *mpl*-liganden som analyseres. Et biotinylert, polyklonalt kaninantistoff mot *mpl*-ligand (TPO₁₅₅) brukes til å påvise bundet *mpl*-ligand som måles under anvendelse av streptavidin-peroksidase som beskrevet i eksempel 18.

15. Biologisk respons *in vivo* hos normale og subletalt bestrålte mus behandlet med TPO

Både normale og subletalt bestrålte mus ble behandlet

med avkortet og fullengde-TPO isolert fra ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO), *E. coli* og humanembryonyreceller (293-celler). Begge formene av TPO ga i disse tre vertene stimulert blodplateproduksjon hos mus, fullengde-TPO isolert fra CHO
 5 syntes imidlertid å gi den største respons *in vivo*. Disse resultatene indikerer at korrekt glykosylering av det karboksyterminale domene kan være nødvendig for optimal aktivitet *in vivo*.

10 (a) *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153)

"Met"-formen av EPO-domenet (Met i -1-stillingen pluss de første 153 restene i human-TPO) produsert i *E. coli* (se eksempel 23), ble injisert daglig i normale C57-B6-hunnmus
 15 som beskrevet i tekstene til figurene 25A, 25B og 25C. Disse tegningene viser at den ikke-glykosylerte, avkortede form av TPO fremstilt i *E. coli* og gjenfoldet som beskrevet ovenfor, er i stand til å stimulere ca. en to gangers økning i blodplateproduksjon hos normale mus uten å påvirke populasjonen av
 20 de røde eller hvite blodlegemer.

Dette samme molekylet injisert daglig i subletalt bestrålte (¹³⁷Cs) C57-B6-hunnmus som beskrevet i tekstene til figurene 26A, 26B og 26C, stimulerte blodplateutvinning og reduserte minimumsverdien, men hadde ingen effekt på erytrocytter eller leukocytt-
 25 cytter eller leukocytt- eller leukocyttpopulasjonen.

(b) CHO-rhTPO₃₃₂

Fullengdeformen av TPO produsert i CHO og injisert
 30 daglig i normale C57-B6-hunnmus som beskrevet i tekstene til figurene 27A, 27B og 27C, ga ca. en fem gangers økning i blodplateproduksjon hos normale mus uten å påvirke erytrocytt- eller leukocyttpopulasjonen.

35 (c) CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153); 293-rhTPO₃₃₂ og *E. coli*-rhTPO₁₅₅

Doseresponskurver ble konstruert for behandling av

normale mus med rhTPO fra forskjellige cellelinjer (CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153); 293-rhTPO₃₃₂ og *E. coli*-rhTPO₁₅₅) som beskrevet i teksten til fig. 28. Denne figuren viser at alle testede former av molekylet stimulerer blodplateproduksjon, fullengdeformen produsert i CHO har imidlertid den høyeste aktivitet *in vivo*.

(d) CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"klippet"} og CHO-rhTPO₃₃₂

Doseresponskurver ble også konstruert for behandling av normale mus med forskjellige former av rhTPO produsert i CHO (CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"klippet"} og CHO-rhTPO₃₃₂) som beskrevet i teksten til fig. 29. Denne figuren viser at alle testede CHO-former av molekylet stimulerer blodplateproduksjon, men at den 70 Kda store fullengdeform har den høyeste aktivitet *in vivo*.

16. Generell, rekombinant fremstilling av *mpl*-ligand og varianter

Fortrinnsvis fremstilles *mpl*-ligand ved hjelp av standard, rekombinante fremgangsmåter som involverer fremstilling av *mpl*-ligandpolypeptidet ved å dyrke celler transfektert til å uttrykke *mpl*-ligandnukleinsyre (vanligvis ved å transformere cellene med en ekspresjonsvektor) og utvinne polypeptidet fra cellene. Man forestiller seg imidlertid eventuelt at *mpl*-liganden kan fremstilles ved hjelp av homolog rekombinasjon, eller med rekombinante produksjonsmetoder under anvendelse av kontrollelementer innført i celler som allerede inneholder DNA som koder for *mpl*-liganden. For eksempel kan et sterkt promotor/enhancer-element, en suppressor eller et eksogent transkripsjonsmodulatorelement innføres i genomet til den påtenkte vertscelle i tilstrekkelig nærhet og orientering til å påvirke transkripsjonen av DNA som koder for det ønskede *mpl*-ligandpolypeptid. Kontrollelementet koder ikke for *mpl*-liganden, og DNA-en er hjemmehørende i vertscellegenomet. Der-

etter gjøres det en screening med hensyn på celler som lager reseptorpolypeptidet ifølge denne oppfinnelsen, eller med hensyn på forøkte eller reduserte nivåer av ekspresjon, alt etter hva som er ønsket.

- 5 Oppfinnelsen omfatter således en fremgangsmåte for fremstilling av *mpl*-ligand som omfatter å innføre i genomet til en celle som inneholder *mpl*-ligandnukleinsyremolekylet, et transkripsjonsmodulatorelement i tilstrekkelig nærhet og orientering til nukleinsyremolekylet til å påvirke transkripsjon
10 derav, med et eventuelt ytterligere trinn som omfatter dyrking av cellen som inneholder transkripsjonsmodulatorelementet og nukleinsyremolekylet. Oppfinnelsen omfatter også en vertscelle som inneholder det medfødte *mpl*-ligandnukleinsyremolekyl operativt bundet til eksogene kontrollsekvenser som gjenkjen-
15 nes av vertscellen.

A.Isolering av DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptid

- Den DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptid, kan erholdes fra hvilket som helst cDNA-bibliotek fremstilt fra vev
20 som menes å ha *mpl*-ligand-mRNA-en og å uttrykke den på et påvisbart nivå. *Mpl*-ligandgenet kan også fås fra et genom-DNA-bibliotek eller ved hjelp av oligonukleotidsyntese *in vitro* fra den komplette nukleotid- eller aminosyresekvens.

- Biblioteker screenes med prober utformet for å identifisere genet av interesse eller proteinet som kodes av det.
25 For cDNA-ekspresjonsbiblioteker omfatter egnede prober monoklonale eller polyklonale antistoffer som gjenkjenner og spesifikt bindes til *mpl*-liganden. For cDNA-biblioteker omfatter egnede prober oligonukleotider med ca. 20-80 basers lengde
30 som koder for kjente eller antatte deler av *mpl*-ligand-cDNA-en fra den samme eller en annen art; og/eller komplementære eller homologe cDNA-er eller fragmenter derav som koder for det samme eller et lignende gen. Passende prober for screening av genom-DNA-biblioteker omfatter, men er ikke begrenset til,
35 oligonukleotider, cDNA-er eller fragmenter derav som koder for det samme eller et lignende gen, og/eller homologe genom-DNA-er eller fragmenter derav. Screening av cDNA- eller genom-biblioteket med den utvalgte probe kan utføres ved å bruke

standardfremgangsmåter som beskrevet i kapitlene 10-12 i Sambrook et al., *supra*.

Et alternativt middel for å isolere genet som koder for *mpl*-ligand, er å bruke PCR-metodikk som beskrevet i avsnitt 14 i Sambrook et al., *supra*. Denne fremgangsmåten krever
5 bruken av oligonukleotidprober som vil hybridisere til DNA som koder for *mpl*-liganden. Strategier for utvelgelse av oligonukleotider er beskrevet nedenunder.

En foretrukket fremgangsmåte for utøvelse av denne
10 oppfinnelsen er å anvende nøyte utvalgte oligonukleotidsekvenser til å screene cDNA-biblioteker for forskjellige vev, fortrinnsvis human eller porcin nyre (voksen eller føtal), eller levercellelinjer. For eksempel screenes humane fosterlevercellelinje-cDNA-biblioteker med oligonukleotidprobene.
15 Alternativt kan humangenombiblioteker screenes med oligonukleotidprobene.

Oligonukleotidsekvensene valgt som prober, bør ha tilstrekkelig lengde og være tilstrekkelig entydige til at falske, positive resultater minimaliseres. Den eller de aktuelle nukleotidsekvenser utformes vanligvis basert på områder i
20 *mpl*-liganden som har den laveste kodonoverflødighet. Oligonukleotidene kan være degenerert i én eller flere stillinger. Anvendelsen av degenererte oligonukleotider er av særlig viktighet når det screenes et bibliotek fra en art hvor anvendelse av foretrukket kodon ikke er kjent.
25

Oligonukleotidet må merkes slik at det kan påvises etter hybridisering til DNA i biblioteket som screenes. Den foretrukne fremgangsmåte for merking er å anvende ATP (f.eks. $\gamma^{32}\text{P}$) og polynukleotidkinase for å merke 5'-enden til oligonukleotidet radioaktivt. Andre fremgangsmåter kan imidlertid
30 brukes til å merke oligonukleotidet, inkludert, men ikke begrenset til, biotinylering eller enzymerking.

Av særlig interesse er *mpl*-ligandnukleinsyren som koder for et fullengde-*mpl*-ligandpolypeptid. Ved noen foretrukne utførelsesformer omfatter nukleinsyresekvensen den
35 naturlige forekommende *mpl*-ligandsignalsekvens. Nukleinsyre med hele den proteinkodende sekvens fås ved screening av utvalgte cDNA- eller genombiblioteker under anvendelse av den utledede

aminosyresekvens.

B. Aminosyresekvensvarianter av naturlig forekommende
mpl-ligand

5 Aminosyresekvensvarianter av *mpl*-ligand fremstilles ved å innføre passende nukleotidendringer i *mpl*-ligand-DNA-en, eller ved hjelp av syntese *in vitro* av det ønskede *mpl*-ligand-polypeptid. Slike varianter omfatter f.eks. delesjoner fra, eller innføyer eller substitusjoner i, rester i aminosyre-
10 sekvensen til den porcine *mpl*-ligand. For eksempel kan karboksyendedeler av den modne fullengde-*mpl*-ligand fjernes ved hjelp av proteolytisk spalting, enten *in vivo* eller *in vitro*, eller ved kloning og uttrykking av et fragment eller den DNA som koder for fullengde-*mpl*-ligand, for å fremstille en bio-
15 logisk aktiv variant. Enhver kombinasjon av delesjon, innføyelse og substitusjon gjøres for å komme frem til sluttproduktet, forutsatt at sluttkonstruksjonen har den ønskede, biologiske aktivitet. Aminosyreendringene kan også endre posttranslasjonelle prosesser i *mpl*-liganden, slik som endring av antallet eller stillingen til glykosylerings seter. For utformingen av aminosyresekvensvarianter av *mpl*-liganden vil lokaliseringen av mutasjonssetet og typen av mutasjonen avhenge av *mpl*-ligandkarakteritika(ene) som skal modifiseres. Mutasjonssetene kan modifiseres individuelt eller i serier, f.eks. ved
20 (1) å substituere først med konservative aminosyrevalg og så med mer radikale utvelgelser avhengig av resultatene som oppnås, (2) delere målrestene eller (3) innføye rester av den samme eller en annen klasse ved siden av det lokaliserte sete, eller kombinasjoner av mulighetene 1-3.

30 En anvendbar fremgangsmåte for identifikasjon av visse rester eller områder i *mpl*-ligandpolypeptidet som er foretrukne steder for mutagenese, kalles "alaninscanningmutagenese", som beskrevet av Cunningham og Wells, Science, 244:1081-1085 (1989). Her identifiseres en rest eller gruppe
35 av målrester (f.eks. ladede rester, slik som arg, asp, his, lys og glu) og erstattes av hvilken som helst, men fortrinnsvis en nøytral eller negativt ladet aminosyre (helst alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonen mellom amino-

syrene og det omgivende, vandige miljø i eller utenfor cellen. De domenene som utviser funksjonell sensitivitet for substitusjonene, forfines så ved å innføre ytterligere eller andre varianter i eller for substitusjonssetene. Selv om stedet for
5 innføring av en aminosyresekvensvariasjon er forutbestemt, behøver således ikke typen av mutasjon som sådan å være forutbestemt. For å optimalisere utførelsen av en mutasjon på et bestemt sted utføres f.eks. ala-scanning eller vilkårlig mutagenese i målkodonet eller -området, og de uttrykte *mpl*-ligand-
10 varianter screenes med hensyn på den optimale kombinasjon av ønsket aktivitet.

Det er to prinsipale, variable størrelser ved konstruksjonen av aminosyresekvensvarianter: lokaliseringen av mutasjonssetet og typen av mutasjon. For eksempel omfatter
15 varianter av *mpl*-ligandpolypeptidet varianter fra *mpl*-ligandsekvensen og kan utgjøre naturlig forekommende alleler (som ikke vil kreve manipulasjon av *mpl*-ligand-DNA-en) eller forutbestemte mutantformer laget ved å mutere DNA-en, for å komme frem til enten et allel eller en variant som ikke finnes i
20 naturen. Generelt vil lokaliseringen og typen av mutasjonen som velges, avhenge av det *mpl*-ligandkarakteristikum som skal modifiseres.

Aminosyresekvensdelesjoner varierer generelt fra ca. 1 til 30 rester, mer foretrukket ca. 1 til 10 rester, og vanligvis sammenhengende. Alternativt kan aminosyresekvensdelesjoner for *mpl*-liganden omfatte en del av eller hele karboksyendeglykoproteindomenet. Aminosyresekvensdelesjoner kan også omfatte én eller flere av de første 6 aminoenderestene til det modne protein. Eventuelle aminosyresekvensdelesjoner omfatter
30 én eller flere rester i ett eller flere av sløyfeområdene som foreligger mellom de "heliske bunter". Sammenhengende delesjoner lages vanligvis i liketallsantall av rester, men enkelt- eller uliketallsantall av delesjoner er innenfor omfanget her. Delesjoner kan innføres i områder med lav homologi
35 blant *mpl*-ligandene som har til felles mesteparten av sekvensidentiteten, for å modifisere aktiviteten av *mpl*-liganden. Eller delesjoner kan innføres i områder med lav homologi blant human-*mpl*-ligand og andre pattedyr-*mpl*-ligandpolypeptider som

har til felles mesteparten av sekvensidentiteten til human-*mpl*-liganden. Delesjoner fra et pattedyr-*mpl*-ligandpolypeptid i områder med vesentlig homologi med andre pattedyr-*mpl*-ligander vil det være mer sannsynlig modifiserer den biologiske aktivitet av *mpl*-liganden mer signifikant. Antallet av på hverandre følgende delesjoner vil bli valgt slik at tertiærstrukturen til *mpl*-ligander i det påvirkede domene bevares, f.eks. beta-foldet ark eller alfa-heliks.

Aminosyresekvensinnføyerelser omfatter amino- og/eller karboksylterminale fusjoner som i lengde varierer fra én rest til polypeptider som inneholder 100 eller flere rester, samt intrasekvensinnføyerelser i enkelt- eller multippelaminosyre-rester. Intrasekvensinnføyerelser (dvs. innføyerelser innenfor den modne *mpl*-ligandsekvens) kan generelt variere fra ca. 1 til 10 rester, mer foretrukket 1 til 5, mest foretrukket 1 til 3. En eksempelvis foretrukket fusjon er den mellom *mpl*-ligand eller et fragment derav og et annet cytokin eller fragment derav. Eksempler på terminale innføyerelser omfatter moden-*mpl*-ligand med en N-terminal metionylrest, en artefakt av den direkte ekspresjon av moden *mpl*-ligand i rekombinant cellekultur, og fusjon av en heterolog, N-terminal signalsekvens til N-enden av det modne *mpl*-ligandmolekyl for å lette utskillelsen av moden *mpl*-ligand fra rekombinante verter. Slike signalsekvenser vil generelt bli beholdt fra, og således være homologe med, den påtenkte vertscelleart. Egnede sekvenser omfatter STII eller Ipp for *E. coli*, alfa-faktor for gjær og virus-signaler, slik som herpes-gD for pattedyrceller.

Andre innføyelsesvarianter i *mpl*-ligandmolekylet omfatter fusjonen til N- eller C-enden av *mpl*-ligand i immunogene polypeptider (dvs. ikke endogene til verten som fusjonene administreres til), f.eks. bakteriepolypeptider, slik som beta-laktamase eller et enzym som kodes for av *E. coli*-*trp*-stedet, eller gjærprotein, og C-terminale fusjoner med proteiner som har langvarig halveringstid, slik som konstante områder i immunglobulin (eller andre områder i immunglobulin), albumin eller ferritin, som beskrevet i WO 89/02922, publisert 6. april 1989.

En tredje gruppe av varianter er aminosyresubstitu-

sjonsvarianter. Disse variantene har minst én aminosyrerest i *mpl*-ligandmolekylet fjernet og en annen rest innføyet i dens sted. Setene av størst interesse for substitusjonsmutagenese omfatter seter identifisert som det eller de aktive seter i *mpl*-ligand, og seter hvor aminosyrene som finnes i andre analoger, er i det vesentlige forskjellige når det gjelder sidekjedevolum, ladning eller hydrofobisitet, men hvor det også er en høy grad av sekvensidentitet i det utvalgte sete mellom forskjellige *mpl*-ligandarter og/eller innenfor de forskjellige dyreanalogene av ett *mpl*-ligandmedlem.

Andre seter av interesse er de hvor bestemte rester av den erholdte *mpl*-ligand fra forskjellige familiemedlemmer og/eller dyrearter innenfor ett medlem er identiske. Disse setene, spesielt de som faller innenfor en sekvens med minst tre andre identisk konserverte seter, er substituert på en forholdsvis konservativ måte. Slike konservative substitusjoner er vist i tabell 3 under overskriften "foretrukne substitusjoner". Dersom slike substitusjoner resulterer i en endring i biologisk aktivitet, innføres mer vesentlige endringer, betegnet eksempelvis substitusjoner i tabell 3, eller som ytterligere beskrevet nedenunder med henvisning til aminosyreklasser, og produktene screenes.

Tabell 3

	Opprinnelig rest	Eksempelvis substitusjoner	Foretrukne substitusjoner
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
30	Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
35	Gly (G)	Pro	Pro
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucin	Leu

	Leu (L)	norleucin ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
5	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
	Pro (P)	Gly	Gly
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
10	Trp (W)	Tyr	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucin	Leu

15

Vesentlige modifikasjoner i funksjon eller immunologisk identitet til *mpl*-liganden utføres ved å velge ut substitusjoner som atskiller seg signifikant i sin effekt på opprettholdelse (a) av strukturen til polypeptidryggraden i området for substitusjonen, f.eks. som en ark- eller helikskonformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten til molekylet i målsetet, eller (c) størrelsen til sidekjeden. Naturlig forekommende rester inndeles i grupper basert på felles sidekjedeegenskaper.

- (1)hydrofob: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2)nøytral hydrofil: Cys, Ser, Thr;
- 30 (3)sur: Asp, Glu;
- (4)basisk: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5)rester som påvirker kjedeorientering: Gly, Pro og
- (6)aromatisk: Trp, Tyr, Phe.

Ikke-konservative substitusjoner vil medføre utbytting av et medlem av én av disse klassene med et annet. Slike substituerte rester kan også innføres i de konservative substitusjonssetene, eller mer foretrukket, i de gjenværende (ikke-konserverte) seter.

Ved én utførelsesform av oppfinnelsen er det ønskelig å inaktivere ett eller flere proteasespaltings seter som er til stede i molekylet. Disse setene identifiseres ved inspeksjon av aminosyresekvensen som utkodes, i tilfellet med trypsin, f.eks. en arginyl- eller lysinylrest. Når proteasespaltings-
 5 seter er identifisert, gjøres de inaktive mot proteolytisk spalting ved å bytte ut målresten med en annen rest, fortrinnsvis en basisk rest, slik som glutamin, eller en hydrofob rest, slik som serin; ved å delere resten; eller ved å innføre en prolylrest umiddelbart etter resten.
 10

Ved en annen utførelsesform byttes eventuelle metionylrester bortsett fra startmetionylresten i signalsekvensen, eller eventuell rest lokalisert innenfor ca. tre rester N- eller C-terminalt til hver slik metionylrest, med en annen
 15 rest (fortrinnsvis i overensstemmelse med tabell 3) eller deles. Alternativt innføres ca. 1-3 rester ved siden av slike seter.

Eventuelle cysteinrester som ikke er involvert i opprettholdelse av den korrekte konformasjon for *mpl*-liganden, kan også byttes ut, generelt med serin, for å forbedre den
 20 oksidative stabilitet til molekylet og forhindre avvikende kryssbinding. Det er blitt funnet at det første og fjerde cystein i epo-domenet, nummerert fra aminoenden, er nødvendig for å opprettholde korrekt konformasjon, men at det andre og
 25 tredje ikke er det. Følgelig kan det andre og tredje cystein i epo-domenet byttes ut.

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av *mpl*-ligand, fremstilles ved hjelp av flere forskjellige fremgangsmåter som er kjent innen teknikken. Disse
 30 fremgangsmåtene omfatter, men er ikke begrenset til, isolering fra en naturlig kilde (i tilfellet med naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller fremstilling ved hjelp av oligonukleotidformidlet (eller seterettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere fremstilt
 35 variant- eller en ikke-variantversjon av *mpl*-ligandpolypeptid.

Oligonukleotidformidlet mutagenese er en foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av substitusjons-, delesjons- og innføylesvarianter av *mpl*-ligand-DNA. Denne teknikken er

godt kjent innen fagområdet, som beskrevet av Adelman et al., DNA, 2:183 (1983). I korte trekk endres *mpl*-ligand-DNA ved å hybridisere et oligonukleotid som koder for den ønskede mutasjon til et DNA-templat, hvor templatet er den enkelttrådede form av et plasmid eller en bakteriofag som inneholder den uendrede eller naturlig forekommende DNA-sekvens til *mpl*-ligand. Etter hybridisering brukes en DNA-polymerase for å syntetisere en hel, andre komplementærtråd til templatet som således vil inkorporere oligonukleotidprimeren, og som vil kode for den utvalgte endring i *mpl*-ligand-DNA-en.

Generelt brukes det oligonukleotider som er minst 25 nukleotider lange. Et optimalt oligonukleotid vil ha 12-15 nukleotider som er fullstendig komplementære med templatet på én av sidene til nukleotidet eller nukleotidene som koder for mutasjonen. Dette sikrer at oligonukleotidet vil hybridisere korrekt til det enkelttrådede DNA-templatmolekyl. Oligonukleotidene syntetiseres lett ved å anvende teknikker som er kjent innen faget, slik som den som er beskrevet av Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978).

DNA-templatet kan frembringes ved hjelp av de vektorene som enten er avledet fra bakteriofag M13-vektorer (de kommersielt tilgjengelige M13mp18- og M13mp19-vektorene er egnet), eller de vektorene som inneholder et enkelttrådet fag-replikasjonsopprinnelsessted, som beskrevet av Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). DNA-en som skal muteres, kan således innføres i én av disse vektorene for å frembringe enkelttrådet templat. Fremstilling av det enkelttrådede templat er beskrevet i avsnittene 4.21-4.41 i Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 1989).

Alternativt kan enkelttrådet DNA-templat frembringes ved å denaturere dobbelttrådet plasmid- (eller annen) DNA under anvendelse av standardteknikker.

For endring av den naturlig forekommende DNA-sekvens (for eksempel for å frembringe aminosyresekvensvarianter) hybridiseres oligonukleotidet til det enkelttrådede templat under egnede hybridiseringsbetingelser. Et DNA-polymeriserende enzym, vanligvis Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I, til-

settes så for å syntetisere den komplementære tråd i templatet under anvendelse av oligonukleotidet som en primer for syntese. Et heterodupleksmolekyl dannes således slik at én tråd i DNA koder for den muterte form av *mpl*-liganden, og den andre tråd (det opprinnelige templat) koder for den naturlig forekommende, uendrede sekvens i *mpl*-liganden. Dette heterodupleksmolekylet transformeres så til en egnet vertscelle, vanligvis en slik prokaryot som *E. coli* JM101. Etter at cellene er dyrket, plates de ut på agaroseplater og screenes under anvendelse av oligonukleotidprimeren som er radioaktivt merket med 32-fosfat, for å identifisere bakteriekoloniene som inneholder den muterte DNA. Det muterte område fjernes så og plasseres i en passende vektor for proteinproduksjon, generelt en ekspresjonsvektor av den type som vanligvis anvendes for transformasjon av en passende vert.

Frengangsmåten beskrevet umiddelbart ovenfor, kan modifiseres slik at det skapes et homodupleksmolekyl hvor begge trådene i plasmidet inneholder mutasjonen(e). Modifikasjonene er som følger: Det enkelttrådede oligonukleotid annealeres til det enkelttrådede templat som beskrevet ovenfor. En blanding av tre deoksyribonukleotider, deoksyriboadenosin (dATP), deoksyriboguanosin (dGTP) og deoksyribotymidin (dTTP) kombineres med et modifisert tiodeoksyribo-cytosin kalt dCTP-(aS) (som kan fås fra Amersham Corporation). Denne blanding tilsettes til templat-oligonukleotid-komplekset. Etter tilsetning av DNA-polymerase til denne blanding frembringes en DNA-tråd som er identisk med templatet, bortsett fra de muterte baser. I tillegg vil denne nye DNA-tråden inneholde dCTP-(aS) i stedet for dCTP, noe som tjener til å beskytte den mot restriksjonsendonukleasefordøyelse.

Etter at templattråden i den dobbelttrådede heterodupleks er blitt "nicked" med et passende restriksjonsenzym, kan templattråden fordøyes med *ExoIII*-nuklease eller en annen passende nuklease forbi det område som inneholder setet eller setene som skal mutageniseres. Reaksjonen stanses så, hvorved man får et molekyl som er bare delvis enkelttrådet. En komplett, dobbelttrådet DNA-homodupleks dannes så ved å anvende DNA-polymerase i nærvær av alle fire deoksyribonukleotidtri-

fosfatene, ATP og DNA-ligase. Dette homodupleksmolekyl kan så transformeres inn i en egnet vertscelle, slik som *E. coli* JM101, som beskrevet ovenfor.

DNA som koder for *mpl*-ligandmutanter med mer enn én
5 aminosyre som skal byttes ut, kan frembringes på én av flere måter. Dersom aminosyrene befinner seg nært sammen i polypeptidkjeden, kan de muteres samtidig under anvendelse av et oligonukleotid som koder for alle de ønskede aminosyresubstitusjonene. Dersom aminosyrene imidlertid befinner seg i en
10 viss avstand fra hverandre (atskilt med mer enn ca. 10 aminosyrer), er det vanskeligere å frembringe et enkeltoligonukleotid som koder for alle de ønskede endringer. I stedet kan det anvendes én av to alternative fremgangsmåter.

Ved den første fremgangsmåten frembringes et separat
15 oligonukleotid for hver aminosyre som skal byttes ut. Oligonukleotidene annealeres så til den enkelttrådede templat-DNA samtidig, og den andre DNA-tråd som syntetiseres fra templatet, vil kode for alle de ønskede aminosyresubstitusjonene.

Den alternative fremgangsmåte omfatter to eller flere
20 runder med mutagenese for å fremstille den ønskede mutant. Den første runden er som beskrevet for enkeltmutantene: villtype-DNA brukes til templatet, et oligonukleotid som koder for den eller de første ønskede aminosyresubstitusjon(er), annealeres til dette templat, og heterodupleks-DNA-molekylet frembringes
25 så. Den andre mutageneserunden gjør bruk av den muterte DNA fremstilt i den første runden med mutagenese som templat. Dette templat inneholder således allerede én eller flere mutasjoner. Oligonukleotidet som koder for den eller de ytterligere ønskede aminosyresubstitusjon(er), annealeres så
30 til dette templat, og den resulterende DNA-tråd koder nå for mutasjoner fra både den første og andre runden med mutagenese. Denne resulterende DNA kan brukes som et templat i en tredje mutageneserunde, og så videre.

PCR-mutagenese er også egnet for å fremstille amino-
35 syrevarianter av *mpl*-ligandpolypeptid. Selv om den følgende omtale henviser til DNA, skal det forstås at teknikken også finner anvendelse med RNA. PCR-teknikken henviser generelt til den følgende fremgangsmåte (se Erlich, *supra*, kapitlet av R.

Higuchi, s. 61-70): Når det anvendes små mengder templat-DNA som utgangsmateriale ved en PCR, kan det brukes primere som atskiller seg noe i sekvens fra det tilsvarende område i en templat-DNA, til å frembringe forholdsvis store mengder av et spesifikt DNA-fragment som atskiller seg fra templatsekvensen bare i stillingene hvor primerne atskiller seg fra templatet. For innføring av en mutasjon i en plasmid-DNA utformes én av primerne slik at den overlapper stillingen til mutasjonen og slik at den inneholder mutasjonen; sekvensen til den andre primeren må være identisk med en sekvensstrekning i den motsatte tråd i plasmidet, men denne sekvens kan lokaliseres hvor som helst langs plasmid-DNA-en. Det er imidlertid foretrukket at sekvensen til den andre primer befinner seg innenfor 200 nukleotider fra sekvensen til den første, slik at til sist hele det amplifiserte DNA-område bundet ved hjelp av primerne, kan sekvenseres lett. PCR-amplifikasjon under anvendelse av et primerpar som det ene som nettopp er blitt beskrevet, resulterer i en populasjon av DNA-fragmenter som atskiller seg i stillingen til mutasjonen spesifisert ved hjelp av primeren, og muligens i andre stillinger, ettersom templatkopiering er noe tilbøyelig til å gi feil.

Dersom forholdet mellom templat og produktmateriale er svært lavt, inkorporerer det store flertall av produkt-DNA-fragmenter den eller de ønskede mutasjon(er). Dette produktmateriale brukes til å erstatte det tilsvarende område i plasmidet som tjener som PCR-templat, under anvendelse av standard DNA-teknikk. Mutasjoner i separate stillinger kan innføres samtidig ved enten å anvende en mutant, andre primer, eller utføre en andre PCR med forskjellige mutantprimere og ligere de to resulterende PCR-fragmenter samtidig til vektorfragmentet i en tredel (eller høyere) ligering.

Ved et spesifikt eksempel på PCR-mutagenese lineariseres templat-plasmid-DNA (1 µg) ved fordøyelse med en restriksjonsendonuklease som har et unikt gjenkjennelsessete i plasmid-DNA-en utenfor området som skal amplifiseres. Av dette materiale tilsettes 100 ng til en PCR-blanding som inneholder PCR-buffer, som inneholder de fire deoksynukleotidtrifosfatene og er inkludert i "GeneAmp"-settene (erholdt fra Perkin-Elmer

Cetus, Norwalk, CT og Emeryville, CA), og 25 pmol av hver oligonukleotidprimer, inntil et sluttvolum på 50 µl. Reaksjonsblandingen belegges med 35 µl mineralolje. Reaksjonsblandingen denatureres i 5 minutter ved 100 °C, plasseres en kort
 5 tid på is, og så tilsettes 1 µl *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-polymerase (5 enheter/µl, innkjøpt fra Perkin-Elmer Cetus) under mineraloljelaget. Reaksjonsblandingen innføres så i en "DNA Thermal Cycler" (innkjøpt fra Perkin-Elmer Cetus) programmert på følgende måte:

10

2 min. ved 55 °C,
 30 sek. ved 72 °C, så 19 sykluser med:
 30 sek. ved 94 °C,
 30 sek. ved 55 °C og
 15 30 sek. ved 72 °C.

20

Ved slutten av programmet fjernes reaksjonsglasset fra varmesykliseringsapparatet, og vannfasen overføres til et nytt glass, ekstraheres med fenol/kloroform (50:50 vol), og etanol utfelles, og DNA-en utvinnes ved hjelp av standardfremgangsmåter. Dette materiale underkastes deretter de passende
 20 behandlinger for innføyelse i en vektor.

30

En annen fremgangsmåte for fremstilling av varianter, kassettmutagenese, er basert på teknikken beskrevet av Wells
 25 et al., Gene, 34:315 (1985). Utgangsmaterialet er plasmidet (eller en annen vektor) som omfatter *mpl*-ligand-DNA-en som skal muteres. Kodonet eller kodonene i *mpl*-ligand-DNA-en som skal muteres, identifiseres. Det må være et unikt restriksjonsendonukleasesete på hver side av det eller de identifiserte mutasjonssete(r). Dersom det ikke foreligger noen slike
 30 restriksjonsseter, kan de frembringes ved å bruke den ovenfor beskrevne oligonukleotidmedierte mutagenesefremgangsmåte for å innføre dem på passende steder i *mpl*-ligand-DNA-en. Etter at restriksjonssetene er blitt innført i plasmidet, kuttet plasmidet i disse setene for å linearisere det. Et dobbelttrådet
 35 oligonukleotid som koder for sekvensen til DNA-en mellom restriksjonssetene, men som inneholder den eller de ønskede mutasjon(er), syntetiseres under anvendelse av standardfremgangs-

måter. De to trådene syntetiseres separat og hybridiseres så sammen under anvendelse av standardteknikker. Det dobbelttrådede oligonukleotid henvises til som kassetten. Denne kassett utformes slik at den har 3'- og 5'-ender som er forenlige med endene til det lineariserte plasmid slik at det kan ligeres direkte til plasmidet. Dette plasmid inneholder nå den muterte *mpl*-ligand-DNA-sekvens.

C. Innføyelse av nukleinsyre i en replikerbar vektor

Nukleinsyren (f.eks. cDNA eller genom-DNA) som koder for naturlig forekommende eller variant-*mpl*-ligandpolypeptid, innføres i en replikerbar vektor for ytterligere kloning (amplifikasjon av DNA-en) eller for ekspresjon. Mange vektorer er tilgjengelige, og utvalgelse av den passende vektor vil avhenge av (1) hvorvidt den skal anvendes for DNA-amplifikasjon eller for DNA-ekspresjon, (2) størrelsen til nukleinsyren som skal innføres i vektoren, og (3) vertscellen som skal transformeres med vektoren. Hver vektor inneholder forskjellige komponenter avhengig av dens funksjon (amplifikasjon av DNA eller ekspresjon av DNA) og vertscellen som den er forenlig med. Vektorkomponentene omfatter generelt, men er ikke begrenset til, én eller flere av de følgende: en signalsekvens, et replikasjonsopprinnelsessted, ett eller flere markørgener, et enhancerelement, en promoter og en transkripsjons-termineringssekvens.

(i) Signalsekvenskomponent

Mpl-liganden ifølge denne oppfinnelsen kan uttrykkes ikke bare direkte, men også som en fusjon med et heterologt polypeptid, fortrinnsvis en signalsekvens eller annet polypeptid som er et spesifikt spaltingssete i N-enden av det modne protein eller polypeptid. Generelt kan signalsekvensen være en komponent i vektoren, eller den kan være en del av *mpl*-ligand-DNA-en som innføres i vektoren. Den valgte, heterologe signalsekvens bør være én som gjenkjennes og prosesseres (dvs. spaltes ved hjelp av en signalpeptidase) av vertscellen. For prokaryote vertsceller som ikke gjenkjenner og prosesserer den naturlig forekommende *mpl*-ligandsignalsekvens, byttes signal-

sekvensen ut med en prokaryot signalsekvens valgt f.eks. fra gruppen av alkalisk fosfatase, penicillinase, lpp eller varme-stabile enterotoksin II-ledere. For gjærsekresjon kan den naturlig forekommende signalsekvens byttes ut med f.eks. gjær-
 5 invertasen, α -faktoren eller de sure fosfataselederne, *C. albicans*-glukoamylaselederen (EP 362 179 publisert 4. april 1990) eller signalet beskrevet i WO 90/13646, publisert 15. november 1990. Ved pattedyrcelleekspresjon er den naturlig forekommende signalsekvens (dvs. *mpl*-ligandforsekvensen som
 10 normalt styrer sekresjon av *mpl*-ligand fra dens naturlig forekommende pattedyrceller *in vivo*) tilfredsstillende, selv om andre pattedyrsignalsekvenser kan være egnet, slik som signalsekvenser fra andre *mpl*-ligandpolypeptider eller fra den samme *mpl*-ligand fra en annen dyreart, signalsekvenser fra en *mpl*-
 15 ligand og signalsekvenser fra utskilte polypeptider fra den samme eller beslektede arter, samt virussekretoriske ledere, f.eks. herpes simplex gD-signalet.

(ii) Replikasjonsopprinnelsesstedskomponent

20 Både ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder en nukleinsyresekvens som gjør det mulig for vektoren å replikere i én eller flere utvalgte vertsceller. Generelt er denne sekvensen i kloningsvektorer én som gjør det mulig for vektoren å replikere uavhengig av vertens kromosom-DNA, og omfatter
 25 replikasjonsopprinnelsessteder eller autonomt replikerende sekvenser. Slike sekvenser er godt kjent for mange forskjellige bakterier, gjær og virus. Replikasjonsopprinnelsesstedet fra plasmidet pBR322 er egnet for de fleste gramnegative bakterier, 2 μ -plasmidopprinnelsesstedet er egnet for gjær, og
 30 forskjellige virusopprinnelsessteder (SV40, polyom, adeno-virus, VSV eller BPV) kan anvendes for kloning av vektorer i pattedyrceller. Generelt trengs ikke replikasjonsopprinnelsesstedskomponenten for pattedyrekspresjonsvektorer (SV40-opprinnelsesstedet kan vanligvis brukes bare fordi det inneholder
 35 den tidlige promoter).

De fleste ekspresjonsvektorer er "ferge"-vektorer, dvs. at de er i stand til replikasjon i minst én klasse organismer, men kan transfekteres til en annen organisme for eks-

presjon. For eksempel kloner en vektor i *E. coli*, og den samme vektoren transfekteres så i gjær- eller pattedyrceller for ekspresjon selv om den ikke er i stand til å replikere uavhengig av vertscellekromosomet.

5 DNA kan også amplifiseres ved innføring av det i vertsgenomet. Dette gjøres lett ved å bruke *Bacillus*-arter som verter, f.eks. ved å inkludere i vektoren en DNA-sekvens som er komplementær til en sekvens som finnes i *Bacillus*-genom-DNA. Transfeksjon med *Bacillus* med denne vektor resulterer i
10 homolog rekombinasjon med genomet og innføring av eventuell *mpl*-ligand-DNA. Utvinningen av genom-DNA som koder for *mpl*-ligand, er imidlertid mer kompleks enn utvinningen fra en eksogent replikert vektor fordi restriksjonsenzymfordøyelse er påkrevet for å fjerne *mpl*-ligand-DNA-en.

15

(iii) Seleksjonsgenkomponent

Ekspresjons- og kloningsvektorer bør inneholde et seleksjonsgen, også kalt en selekterbar markør. Dette genet koder for et protein som er nødvendig for overlevelsen til
20 eller veksten av transformerte vertsceller som dyrkes i et selektivt dyrkningsmedium. Vertsceller som ikke transformeres med vektoren som inneholder seleksjonsgenet, vil ikke overleve i dyrkningsmediet. Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som (a) gir resistens mot antibiotika eller andre toksiner,
25 f.eks. ampicillin, neomycin, metotrexat eller tetrasyklin, (b) utfyller auxotrofe mangler, eller (c) tilfører næringsstoffer av avgjørende betydning som ikke er tilgjengelige fra komplekst medium, f.eks. genet som koder for D-alaninracemase for basiller.

30 Ett eksempel på et seleksjonsskjema gjør bruk av et legemiddel for å stanse vekst av en vertscelle. De cellene som med hell transformeres med et heterologt gen, uttrykker et protein som gir legemiddelresistens og følgelig overlever seleksjonsregimet. Eksempler på slik dominant seleksjon gjør
35 bruk av legemidlene neomycin (Southern et al., J. Molec. Appl. Genet., 1:327 (1982)), mykofenolsyre (Mulligan et al., Science, 209:1422 (1980)) og hygromycin (Sugden et al., Mol. Cell. Biol., 5:410-413 (1985)). De tre eksemplene gitt oven-

for, gjør bruk av bakterielle gener under eukaryot kontroll for å overføre resistens mot det passende legemiddel, henholdsvis G418 eller neomycin (geneticin), xgpt (mykofenolsyre) eller hygromycin.

5 Eksempler på andre egnede selekterbare markører for pattedyrceller er de som muliggjør identifikasjonen av celler som er kompetente til å ta opp *mpl*-ligandnukleinsyren, slik som dihydrofolatreduktase (DHFR) eller tymidinkinase. Pattedyrcelletransformantene plasseres under seleksjonstrykk som
10 bare transformantene er unikt tilpasset for å overleve i kraft av å ha tatt opp markøren. Seleksjonstrykk påsettes ved å dyrke transformantene under betingelser hvor konsentrasjonen av seleksjonsmiddel i mediet endres suksessivt, for derved å føre til amplifikasjon av både seleksjonsgenet og den DNA som
15 koder for *mpl*-ligandpolypeptid. Amplifikasjon er fremgangsmåten hvorved gener som det er større krav om for produksjonen av et protein som er av avgjørende betydning for vekst, gjentas etter hverandre i kromosomene til på hverandre følgende generasjoner av rekombinante celler. Forøkte mengder av *mpl*-
20 ligand syntetiseres fra den amplifiserte DNA.

For eksempel identifiseres først celler transformert med DHFR-seleksjonsgenet, ved å dyrke alle transformantene i et dyrkningsmedium som inneholder metotrexat (Mtx), en kompetitiv antagonist til DHFR. En passende vertscelle når vill-
25 type-DHFR anvendes, er ovariecellelinjen fra kinesisk hamster (CHO) som mangler DHFR-aktivitet, fremstilt og formert som beskrevet av Urlaub og Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). De transformerte celler eksponeres så mot forøkte Mtx-nivåer. Dette fører til syntese av atskillige kopier
30 av DHFR-genet og samtidig atskillige kopier av annen DNA som omfatter ekspresjonsvektorene, slik som den DNA som koder for *mpl*-ligand. Denne amplifikasjonsteknikken kan brukes med hvilken som helst ellers egnet vert, f.eks. ATCC nr. CCL61 CHO-K1, uansett tilstedeværelsen av endogen DHFR dersom det
35 f.eks. anvendes et mutant-DHFR-gen som er svært resistent mot Mtx (EP 117 060). Alternativt kan vertsceller (særlig villtypeverter som inneholder endogen DHFR) transformeres eller samtransformeres med DNA-sekvenser som koder for *mpl*-ligand,

villtype-DHFR-protein og en annen selekterbar markør, slik som aminoglykosid-3'-fosfotransferase (APH), velges ut ved hjelp av cellevekst i medium som inneholder et seleksjonsmiddel for den selekterbare markør, slik som et aminoglykosidantibiotikum, f.eks. kanamycin, neomycin eller G418. Se US patentskrift nr. 4 965 199.

Et egnet seleksjonsgen for bruk i gjær er *trp1*-genet som er til stede i gjærplasmidet YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); eller Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)). *Trp1*-genet gir en seleksjonsmarkør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan, f.eks. ATCC nr. 44076 eller PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). Tilstedeværelsen av *trp1*-lesjonen i gjærvertscellegenomet gir så et effektivt miljø for påvisning av transformasjon ved hjelp av vekst i fravær av tryptofan. Likeledes fullstendiggyøres *Leu2*-manglende gjærstammer (ATCC nr. 20 622 eller 38 626) ved hjelp av kjente plasmider som bærer *Leu2*-genet.

(iv) Promoterkomponent

Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promoter som gjenkjennes av vertsorganismen, og som er operativt bundet til *mpl*-ligandnukleinsyren. Promoterer er utranslaterte sekvenser lokalisert oppstrøms (5') for startkodonet i et strukturelt gen (vanligvis innenfor ca. 100 til 1 000 bp) som kontrollerer transkripsjonen og translasjonen av bestemt nukleinsyresekvens, slik som *mpl*-ligandnukleinsyresekvensen, som det er operativt bundet til. Slike promoterer faller vanligvis innenfor to klasser, induserbare og konstitutive. Induserbare promoterer er promoterer som initierer økte nivåer av transkripsjon fra DNA under deres kontroll, som svar på en eller annen endring i dyrkningsbetingelser, f.eks. tilstedeværelse eller fravær av et næringsstoff eller en endring i temperatur. Det er nå kjent et stort antall promoterer som gjenkjennes av mange forskjellige potensielle vertsceller. Disse promoterne bindes operativt til *mpl*-ligandkodende DNA ved å fjerne promoterene fra kilde-DNA-en ved hjelp av restriksjons-

sjonsenzymfordøyelse og innføyelse av den isolerte promotersekvens i vektoren. Både den naturlig forekommende *mpl*-ligand-promotersekvens og mange heterologe promoterer kan brukes til å styre amplifikasjon og/eller ekspresjon av *mpl*-ligand-DNA-
5 en. Heterologe promoterer er imidlertid foretrukket ettersom de generelt tillater større transkripsjon og høyere utbytter av uttrykt *mpl*-ligand sammenlignet med den naturlig forekommende *mpl*-ligandpromoter.

Promoterer egnet for anvendelse med prokaryote
10 verter, omfatter β -laktamase- og laktosepromotersystemene (Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); og Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)), alkalisk fosfatase, et tryptofan- (*trp*-)promotersystem (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980) og EP 36 776) og hybridpromoterer, slik som *tac*-promoteren (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)). Det er imidlertid også egnet med andre, kjente bakteriepromoterer. Deres nukleotidsekvenser er blitt publisert, hvorved det muliggjøres for en gjennomsnittsfagmann operativt å ligere dem til DNA som koder for *mpl*-ligand (Siebenlist et
20 al., *Cell*, 20:269 (1980)) ved å anvende linkere eller adaptorer for å tilføre eventuelle påkrevde restriksjonssteder. Promoterer for anvendelse i bakteriesystemer vil også inneholde en Shine-Dalgarno-sekvens (S.D.) operativt bundet til den DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptid.

Promotersekvenser er kjent for eukaryoter. Praktisk
25 talt alle eukaryote gener har et AT-rikt område lokalisert omtrent 25 til 30 baser oppstrøms for setet hvor transkripsjon initieres. En annen sekvens som finnes 70-80 baser oppstrøms fra transkripsjonsstarten i mange gener, er et CXCAAT-område
30 hvor X kan være hvilket som helst nukleotid. I 3'-enden av de fleste eukaryote gener er det en AATAAA-sekvens som kan være signalet for addisjon av poly A-halen til 3'-enden av den kodende sekvens. Alle disse sekvensene innføres på egnet måte i eukaryote ekspresjonsvektorer.

35 Eksempler på egnede promotersekvenser for anvendelse med gjærverter omfatter promoterne for 3-fosfoglyseratkinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)) eller andre glykolytiske enzymer (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149

(1968); og Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), slik som enolase, glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfatiso-
merase, 3-fosfoglyseratmutase, pyruvatkinase, triosefosfatiso-
5 merase, fosfoglukoseisomerase og glukokinase.

Andre gjærpromoterer som er induserbare promoterer med den ytterligere fordel av transkripsjon kontrollert ved hjelp av vekstbetingelser, er promoterområdene for alkohol-
dehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, nedbrytbare
10 enzymer forbundet med nitrogenmetabolisme, metallotionein, glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase og enzymer som er ansvar-
lige for maltose- og galaktoseutnyttelse. Egnede vektorer og promoterer for anvendelse i gjærekspresjon, er videre be-
skrevet i Hitzeman et al., EP 73 657A. Gjærenhancere anvendes
15 også med fordel sammen med gjærpromoterer.

Mpl-ligandtranskripsjon fra vektorer i pattedyrverts-
celler kontrolleres f.eks. ved hjelp av promoterer erholdt fra
genomene til virus, slik som polyomvirus, fuglekoppevirus (UK
2 211 504 publisert 5. juli 1989), adenovirus (slik som
20 Adenovirus 2), bovint papillomvirus, fuglesarkomvirus, cyto-
megalovirus, et retrovirus, hepatitt-B-virus og mest foretruk-
ket apevirus 40 (SV40), hvorfra heterologe pattedyrpromoterer,
f.eks. aktinpromoterer eller en immunglobulinpromoter, fra
varmesjokkpromoterer og fra promoterer normalt forbundet med
25 mpl-ligandsekvensen, forutsatt at slike promoterer er foren-
lige med vertscellesystemene.

De tidlige og sene promoterne i SV40-viruset erholdes
passende som et SV40-restriksjonsfragment som også inneholder
SV40-virusreplikasjonsopprinnelsesstedet. Fiers et al.,
30 Nature, 273:113 (1978); Mulligan og Berg, Science, 209:1422-
1427 (1980); Pavlakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
78:7398-7402 (1981). Den umiddelbare tidlige promoter i human-
cytomegaloviruset erholdes på passende måte som et HindIII E-
restriksjonsfragment. Greenaway et al., Gene, 18:355-360
35 (1982). Et system for å uttrykke DNA i pattedyrverter under
anvendelse av det bovine papillomvirus som vektor, er be-
skrevet i US patentskrift nr. 4 419 446. En modifikasjon av
dette systemet er beskrevet i US patentskrift nr. 4 601 978.

Se også Gray et al., Nature, 295:503-508 (1982) vedrørende uttrykking av cDNA som koder for immuninterferon i apeceller; Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982) vedrørende ekspresjon av human β -interferon-cDNA i museceller under kontroll av en
 5 tymidinkinasepromoter fra herpes simplex-virus; Canaani og Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5166-5170 (1982) vedrørende ekspresjon av humaninterferon- β 1-genet i dyrkede muse- og kaninceller; og Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6777-6781 (1982) vedrørende ekspresjon av bakterie-CAT-sekvenser i CV-1-apenyreceller, kyllingembryofibroblaster,
 10 ovarieceller fra kinesisk hamster, HeLa-celler og muse-NIH-3T3-celler under anvendelse av den lange, terminale gjentakelsen fra Rous sarkomvirus som promoter.

15 (v) Enhancerelementkomponent

Transkripsjon av en DNA som koder for *mpl*-liganden ifølge denne oppfinnelsen ved hjelp av høyere eukaryoter, økes ofte ved å innføre en enhancersekvens i vektoren. Enhancere er cis-virkende elementer i DNA, vanligvis ca. 10 til 300 bp, som
 20 virker på en promoter til å øke dens transkripsjon. Enhancere er forholdsvis orienterings- og stillingsuavhengige, idet det er blitt funnet 5' (Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:993 (1981)) og 3' (Lusky et al., Mol. Cell Bio., 3:1108 (1983)) i forhold til transkripsjonsenheten, innenfor
 25 et intron (Banerji et al., Cell, 33:729 (1983)), samt innenfor selve den kodende sekvens (Osborne et al., Mol. Cell Bio., 4:1293 (1984)). Mange enhancersekvenser er nå kjent fra pattedyrgener (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Man vil imidlertid vanligvis bruke en enhancer fra et
 30 virus for eukaryot celle. Eksempler omfatter SV40-enhanceren på den sene siden til replikasjonsopprinnelsesstedet (bp 100-270), cytomegalovirusets tidlige promoterenhancer, polyoma-enhanceren på den sene siden til replikasjonsopprinnelsesstedet, og adenovirusenhancere. Se også Yaniv, Nature, 297:17-
 35 18 (1982) vedrørende enhancerelementer for aktivering av eukaryote promoterer. Enhanceren kan spleises inn i vektoren i en stilling 5' eller 3' i forhold til den *mpl*-ligandkodende sekvens, men befinner seg fortrinnsvis på et sted 5' fra pro-

moteren.

(vi) Transkripsjonstermineringskomponent

Ekspresjonsvektorer som brukes i eukaryote vertsceller (gjær, sopp, insekt, plante, dyr, menneske eller kjernedannede celler fra andre flercellede organismer), vil også inneholde sekvenser som er nødvendige for avslutningen av transkripsjon og for stabilisering av mRNA-en. Slike sekvenser er vanlig tilgjengelige fra de 5'- og, av og til, 3'-utranslaterte områder i eukaryote eller virus-DNA-er eller cDNA-er. Disse områdene inneholder nukleotidsegmenter transkribert som polyadenylerte fragmenter i den utranslaterte del av mRNA-en som koder for *mpl*-ligand.

15 (vii) Konstruksjon og analyse av vektorer

Konstruksjon av egnede vektorer som inneholder én eller flere av de ovenfor angitte komponenter, gjør bruk av standardligeringssteknikker. Isolerte plasmider eller DNA-fragmenter spaltes, skreddersys og religeres i den form som er ønsket for å frembringe plasmidene som er påkrevet.

For analyse for å bekrefte korrekte sekvenser i konstruerte plasmider brukes ligeringsblandingene til å transformere *E. coli* K12-stamme 294 (ATCC nr. 31 446), og vellykkede transformanter selekteres ved hjelp av ampicillin eller tetrasyklinresistens, etter hva som er passende. Plasmider fra transformantene fremstilles, analyseres ved hjelp av restriksjonsendonukleasefordøyelse og/eller sekvenseres ved hjelp av fremgangsmåten til Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981), eller ved hjelp av fremgangsmåten til Maxam et al., *Methods in Enzymology*, 65:499 (1980).

(viii) Transiente ekspresjonsvektorer

Særlig anvendbare ved utøvelsen av denne oppfinnelsen er ekspresjonsvektorer som sørger for den transiente ekspresjon i pattedyrceller av DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptidet. Generelt involverer transient ekspresjon bruken av en ekspresjonsvektor som er i stand til å replikere effektivt i en vertscelle, slik at vertscellen akkumulerer mange kopier av

ekspressjonsvektoren og deretter syntetiserer høye nivåer av et ønsket polypeptid som kodes for av ekspressjonsvektoren. Sambrook et al., *supra*, s. 16.17-16.22. Transiente ekspressjonssystemer som omfatter en egnet ekspressjonsvektor og en vertscelle, muliggjør den lettvinde, positive identifikasjon av polypeptider som kodes for av klonede DNA-er, samt den hurtige screening av slike polypeptider med hensyn på ønskede biologiske eller fysiologiske egenskaper. Transiente ekspressjonssystemer er således særlig anvendbare i forbindelse med oppfinnelsen for de formål å identifisere analoger og varianter av *mpl*-ligandpolypeptid som har den biologiske aktivitet til *mpl*-ligandpolypeptid.

(ix) Egnede, eksempelvis hvirveldyrrellevektorer

Andre fremgangsmåter, vektorer og vertsceller som er egnet for tilpasning til syntesen av *mpl*-ligand i rekombinant hvirveldyrrellekultur, er beskrevet i Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); Levinson et al., EP 117 060 og EP 117 058. Et særlig anvendbart plasmid for pattedyrrellekulturekspressjon av *mpl*-ligand er pRK5 (EP 307 247, US patentskrift nr. 5 258 287) eller pSVI6B (PCT publikasjonsnr. WO 91/08291).

D. Utvelgelse og transformasjon av vertsceller

Egnede vertsceller for kloning eller uttrykking av vektorene som her er beskrevet, er de prokaryote, gjær- eller høyere eukaryote celler som er beskrevet ovenfor. Egnede prokaryoter omfatter eubakteria, slik som gramnegative eller grampositive organismer, f.eks. *E. coli*, slike basiller som *B. subtilis*, *Pseudomonas*-arter, slik som *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* eller *Serratia marcescens*. En foretrukket *E. coli* kloningsvert er *E. coli* 294 (ATCC nr. 31 446) selv om andre stammer, slik som *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC nr. 31 537) eller *E. coli* W3110 (ATCC nr. 27 325), er egnet. Disse eksemplene er illustrerende snarere enn begrensende. Fortrinnsvis bør vertscellen utskille minimale mengder proteolytiske enzymer. Alternativt er det egnet med *in vitro* kloningsfremgangsmåter, f.eks. PCR eller andre nukleinsyrepolymerase-

reaksjoner.

I tillegg til prokaryoter er slike eukaryote mikrober som filamentære sopper eller gjær, egnede verter for *mpl*-ligandkodende vektorer. *Saccharomyces cerevisiae*, eller vanlig bakergjær, er den mest vanlig brukte blant lavere eukaryote vertsmikroorganismer. En rekke andre slekter, arter og stammer er imidlertid allment tilgjengelige og kan anvendes her, slik som *Schizosaccharomyces pombe* (Beach og Nurse, Nature, 290:140 (1981); EP 139 383 publisert 2. mai 1985), *Kluyveromyces*-verter (US patentskrift nr. 4 943 529) slik som f.eks. *K. lactis* (Louvencourt et al., J. Bacteriol., 737 (1983)), *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans* og *K. marxianus*, *Yarrowia* (EP 402 226), *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244 234), *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)), og slike filamentære sopper som f.eks. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* (WO 91/00357 publisert 10. januar 1991), og slike *Aspergillus*-verter som *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn et al., Gene, 26:205-221 (1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)) og *A. niger* (Kelly og Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)).

Egnede vertsceller for ekspresjon av glykosylert *mpl*-ligand er avledet fra flercellulære organismer. Slike vertsceller har evne til komplekse prosesserings- og glykosyleringsaktiviteter. I prinsippet er enhver høyere eukaryot cellekultur anvendbar, uansett om den er fra kultur av hvirveldyr eller hvirvelløst dyr. Eksempler på celler fra hvirvelløse omfatter plante- og insektceller. Et stort antall baculo-virusstammer og varianter og tilsvarende tillater insektvertsceller fra slike verter som *Spodoptera frugiperda* (kålorm), *Aedes aegypti* (mygg), *Aedes albopictus* (mygg), *Drosophila melanogaster* (bananflue) og *Bombyx mori*, er blitt identifisert. Se f.eks. Luckow et al., Bio/Technology, 6:47-55 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., red., vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), s. 277-279 og Maeda et al., Nature, 315:592-594 (1985). Flere forskjellige virusstam-

mer for transfeksjon er allment tilgjengelige, f.eks. L-1-varianten av *Autographa californica* NPV og Bm-5-stammen av *Bombyx mori* NPV, og slike virus kan brukes som viruset ifølge foreliggende oppfinnelse, særlig for transfeksjon av *Spodoptera frugiperda*-celler.

Plantecellekulturer av bomull, mais, potet, soya-bønne, petunia, tomat og tobakk kan benyttes som verter. Vanligvis transfekteres planteceller ved inkubasjon med visse stammer av bakterien *Agrobacterium tumefaciens* som tidligere er blitt manipulert til å inneholde *mpl*-ligand-DNA-en. Under inkubasjon av plantecellekulturen med *A. tumefaciens* overføres den DNA som koder for *mpl*-liganden, til plantecelleverten slik at den transfekteres og vil, under passende betingelser, uttrykke *mpl*-ligand-DNA-en. I tillegg er regulator- og signal-sekvenser som er forenlige med planteceller, tilgjengelige, slik som nopalinsyntasepromoter og polyadenyleringssignalsekvensene. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1:561 (1982). I tillegg er DNA-segmenter isolert fra oppstrømsområdet til T-DNA 780-genet, i stand til å aktivere eller øke transkripsjonsnivåer for planteuttrykbare gener i rekombinant, DNA-holdig plantevev. EP 321 196 publisert 21. juni 1989.

Interessen har imidlertid vært størst for hvirveldyr-celler, og formering av hvirveldyrceller i kultur (vevskultur) er blitt en rutinefremgangsmåte i de senere år (Tissue Culture, Academic Press, Kruse og Patterson, red. (1973)). Eksempler på anvendbare pattedyrvertscellelinjer er apenyre CV1-linje transformert med SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); humanembryonyrelinje (293- eller 293-celler som er subklonet for vekst i suspensjonskultur, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); nyreceller fra nyfødt hamster (BHK, ATCC CCL 10); ovarieceller fra kinesisk hamster/DHFR (CHO, Urlaub og Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); Sertolis celler fra mus (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); apenyreceller (CV1 ATCC CCL 70); nyreceller fra afrikansk grønnape (VERO-76, ATCC CRL-1587); humane livmorhalskarsinomceller (HELA, ATCC CCL 2); hundenyreceller (MDCK, ATCC CCL 34); bufalorotteleverceller (BRL 3A, ATCC CRL 1442); menneskelungeceller (W138, ATCC CCL 75); menneskeleverceller (Hep G2, HB

8065); musebrysttumor (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI-celler (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); MRC 5-celler; FS4-celler; og en humanhepatomlinje (Hep G2).

Vertsceller transfekteres og transformerer for-
5 trinnsvis med de ovenfor beskrevne ekspresjons- eller klon-
ingsvektorer ifølge denne oppfinnelsen og dyrkes i vanlig nær-
ingsmedium modifisert som passende for induksjon av pro-
moterer, utvelgelse av transformanter eller amplifisering av
genene som koder for de ønskede sekvenser.

10 Transfeksjon henviser til opptaket av en ekspresjons-
vektor ved hjelp av en vertscelle, uansett om det faktisk ut-
trykkes, eller ikke, noen kodende sekvenser. Et stort antall
fremgangsmåter for transfeksjon er kjent for fagfolk, f.eks.
CaPO₄ og elektroporasjon. Vellykket transfeksjon godkjennes
15 generelt når hvilken som helst indikasjon på virkningen av
denne vektorer inntreffer i vertscellen.

Transformasjon betyr innføring av DNA i en organisme
slik at DNA-en blir replikerbar, enten som et ekstrakromosom-
alt element eller ved kromosomal integrasjon. Avhengig av den
20 anvendte vertscelle, gjøres det transformasjon ved å anvende
standardteknikker som er passende for slike celler. Kalsium-
behandlingen som gjør bruk av kalsiumklorid, slik som be-
skrevet i avsnitt 1.82 i Sambrook et al., *supra*, brukes gener-
elt for prokaryoter eller andre celler som inneholder vesent-
25 lige celleveggbarrierer. Infeksjon med *Agrobacterium tumefaci-*
ens brukes for transformasjon av visse planteceller, som be-
skrevet av Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) og i WO 89/05859
publisert 29. juni 1989. I tillegg kan planter transfekteres
under anvendelse av ultralydbehandling som beskrevet i WO
30 91/00358, publisert 10. januar 1991. For pattedyrceller uten
slike cellevegger foretrekkes kalsiumfosfatutfellingsmetoden
til Graham og van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Gener-
elle aspekter ved pattedyrcellevertssystemtransformasjon er
blitt beskrevet av Axel i US patentskrift nr. 4 399 216, be-
35 vilget 16. august 1983. Transformasjoner i gjær utføres van-
ligvis i henhold til metoden til Van Solingen et al., *J.*
Bact., 130:946 (1977) og Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA, 76:3829 (1979). Andre fremgangsmåter for innføring av DNA

i celler, slik som ved hjelp av kjerneinjeksjon, elektroporasjon eller protoplastfusjon, kan imidlertid også anvendes.

E. Dyrking av vertscellene

5 Prokaryote celler som brukes til å fremstille *mpl*-ligandpolypeptidet ifølge denne oppfinnelsen, dyrkes i egnede medier som beskrevet generelt i Sambrook et al., *supra*.

Pattedyrvertscellene som anvendes for å fremstille *mpl*-liganden ifølge denne oppfinnelsen, kan dyrkes i mange
10 forskjellige medier. Slike kommersielt tilgjengelige medier som Ham's F10 (Sigma), minimalt, essensielt medium ((MEM), Sigma), RPMI 1640 (Sigma) og Dulbeccos modifiserte Eagles medium ((DMEM), Sigma), er egnet for dyrking av vertscellene. I tillegg kan det som dyrkingsmedium for vertscellene anvendes
15 hvilket som helst av mediene beskrevet i Ham og Wallace, Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes og Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980), US patentskrift nr. 4 767 704, 4 657 866, 4 927 762 eller 4 560 655, WO 90/03430, WO 87/00195, US patentskrift Re. 30 985, eller i U.S.S.N. 07/592 107 eller 07/592 141, begge
20 innlevert 3. oktober 1990. Hvilket som helst av disse mediene kan suppleres etter behov med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (slik som insulin, transferrin eller epidermal vekstfaktor), salter (slik som natriumklorid, kalsium, magnesium og fosfat), buffere (slik som HEPES), nukleosider (slik som
25 adenosin og tymidin), antibiotika (slik som "Gentamycin"-legemiddel), sporelementer (definert som uorganiske forbindelser som vanligvis er til stede i sluttkonsentrasjoner i mikromolområdet) og glukose eller en ekvivalent energikilde. Eventuelle andre nødvendige supplementer kan også være inkludert ved
30 passende konsentrasjoner som vil være kjent for fagfolk innen teknikken. Dyrkingsbetingelsene, slik som temperatur, pH og lignende, er de som tidligere er brukt for vertscellen valgt for ekspresjon, og vil være åpenbare for fagfolk innen teknikken.

35 Vertscellene henvist til i denne beskrivelsen, omfatter celler i kultur *in vitro* samt celler som befinner seg i et vertsdyr.

F. Påvisning av genamplifikasjon/-ekspresjon

Genamplifikasjon og/eller -ekspresjon kan måles i en prøve direkte, f.eks. ved hjelp av vanlig "Southern blotting", "northern blotting" for å kvantifisere transkripsjonen av mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), "dot blotting" (DNA-analyse) eller *in situ* hybridisering, under anvendelse av en passende merket probe, basert på sekvensene som her er tilveiebrakt. Forskjellige markører kan anvendes, vanligvis radioaktive isotoper, særlig ³²P. Andre teknikker kan imidlertid også anvendes, slik som bruk av biotinmodifiserte nukleotider for innføring i et polynukleotid. Biotinet tjener da som sete for binding til avidin eller antistoffer, som kan merkes med mange forskjellige markører, slik som radionuklider, fluoresceringsmidler, enzymer eller lignende. Alternativt kan det anvendes antistoffer som kan gjenkjenne bestemte duplekser, inkludert DNA-duplekser, RNA-duplekser og DNA-RNA-hybridduplekser eller DNA-proteinduplekser. Antistoffene kan igjen merkes, og analysen kan utføres når duplekser er bundet til en overflate, slik at etter dannelsen av dupleks på overflaten kan tilstedeværelsen av antistoff bundet til duplekser påvises.

Genekspresjon kan alternativt måles ved hjelp av immunologiske metoder, slik som immunohistokjemisk farging av vevssnitt, og analyse av cellekultur eller kroppsvæsker, for å kvantifisere direkte ekspresjonen av genprodukt. Med immunohistokjemiske fargingsteknikker fremstilles en celleprøve, vanligvis ved hjelp av dehydratisering og fiksering, etterfulgt av omsetning med merkede antistoffer som er spesifikke for det tilkoblede genprodukt, hvor markørene vanligvis er visuelt påvisbare, slik som enzymatiske markører, fluorescensmarkører, luminescensmarkører og lignende. En særlig følsom fargingsteknikk som er egnet for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse, er beskrevet av Hsu et al., Am. J. Clin. Path., 75:734-738 (1980).

Antistoffer som kan anvendes til immunohistokjemisk farging og/eller analyse av prøvevæsker, kan være enten monoklonale eller polyklonale og kan fremstilles i hvilket som helst pattedyr. Antistoffene kan passende fremstilles mot et

naturlig forekommende *mpl*-ligandpolypeptid eller mot et syntetisk peptid basert på DNA-sekvensene som her er tilveiebrakt, som beskrevet nærmere nedenunder.

5 G.Rensing av *mpl*-ligandpolypeptid

Mpl-ligand utvinnes fortrinnsvis fra dyrkingsmediet som et utskilt polypeptid selv om det også kan utvinnes fra vertscellelysater når det uttrykkes direkte uten et sekretorisk signal.

10 Når *mpl*-ligand uttrykkes i en annen rekombinant celle enn én av human opprinnelse, er *mpl*-liganden fullstendig fri for proteiner eller polypeptider av human opprinnelse. Det er imidlertid fortsatt vanligvis nødvendig å rense *mpl*-ligand fra andre rekombinante celleproteiner eller -polypeptider for å
15 oppnå preparater som er i det vesentlige homogene med hensyn til *mpl*-liganden per se. Som et første trinn sentrifugeres kulturmediet eller -lysate for å fjerne partikkelformede cellerester. Membran- og de oppløselige proteinfraksjonene separeres så. Alternativt kan det anvendes et kommersielt tilgjengelig
20 proteinkonsentreringsfilter (f.eks. "Amicon" eller "Millipore Pellicon" ultrafiltreringsenheter). *Mpl*-liganden kan så renses fra den oppløselige proteinfraksjon og fra membranfraksjonen i kulturlysate, avhengig av hvorvidt *mpl*-liganden er membranbundet. *Mpl*-ligand renses deretter fra foruren-
25 sende, oppløselige proteiner og polypeptider ved utsalting og bytting av kromatografiske fremgangsmåter under anvendelse av forskjellige gelgrunnmasser. Disse grunnmassene omfatter: akrylamid, agarose, dekstran, cellulose og andre som er vanlige for proteinrensing. Eksempelvis kromatografifremgangs-
30 måter egnet for proteinrensing, omfatter: immunoaffinitet (f.eks. anti-*hmpl*-ligand-Mab), reseptoraffinitet (f.eks. *mpl*-IgG eller protein A-"Sephadex"), hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) (f.eks. eter-, butyl- eller fenyl-"Toyopearl"), lektinkromatografi (f.eks. "Con A-Sephadex", "lentil-lectin-
35 Sephadex"), størrelsesutelukkelse (f.eks. "Sephadex G-75"), kation- og anionbytterkolonner (f.eks. DEAE eller karboksymetyl- og sulfopropylcellulose), og reversfasevæskeskromatografi med høy trykkestyrke (RP-HPLC) (se f.eks. Urdal et al., J.

Chromatog., 296:171 (1984) når det anvendes to sekvensvise RP-HPLC-trinn for å rense rekombinant human-IL-2). Andre rensetrinn omfatter eventuelt: etanolutfelling, ammoniumsulfatutfelling, kromatofokusering, preparativ SDS-PAGE og lignende.

5 Mpl-ligandvarianter hvor rester er blitt delert, innføyet eller byttet ut, utvinnes på samme måte som naturlig forekommende mpl-ligand, idet man tar i betraktning eventuelle vesentlige endringer i egenskaper forårsaket av variasjonen. For eksempel kan fremstilling av en mpl-ligandfusjon med et
10 annet protein eller polypeptid, f.eks. et bakterie- eller virusantigen, lette rensing; en immunoaffinitetskolonne som inneholder antistoff mot antigenet, kan anvendes til å adsorbere fusjonspolypeptidet. Immunoaffinitetskolonner slik som en polyklonal kanin-anti-mpl-ligandkolonne, kan anvendes til å
15 absorbere mpl-ligandvarianten ved å binde den til minst én gjenværende immunepitop. Alternativt kan mpl-liganden renses ved hjelp av affinitetskromatografi under anvendelse av et renset mpl-IgG koblet til en (fortrinnsvis) immobilisert harpiks, slik som "Affi-Gel 10" (Bio-Rad, Richmond, CA) eller
20 lignende, ved hjelp av midler som er godt kjent innen teknikken. En slik proteaseinhibitor som fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), kan også være anvendbar for inhibering av proteolytisk nedbrytning under rensing, og antibiotika kan inkluderes for å forhindre veksten av ytterligere forurensninger. Fagfolk innen
25 teknikken vil forstå at rensetrinn egnet for naturlig forekommende mpl-ligand, kan kreve modifikasjon for å ta hånd om endringer i karakteren til mpl-ligand eller dens varianter etter ekspresjon i rekombinant cellekultur.

30 H.Kovalente modifikasjoner av mpl-ligandpolypeptid

Kovalente modifikasjoner av mpl-ligandpolypeptider er inkludert innenfor omfanget av denne oppfinnelsen. Både naturlig forekommende mpl-ligand- og aminosyresekvensvarianter av mpl-liganden kan modifiseres kovalent. En type av kovalent
35 modifikasjon som er inkludert innenfor omfanget av denne oppfinnelsen, er et mpl-ligandfragment. Variant-mpl-ligandfragmenter med opptil ca. 40 aminosyrerester kan passende fremstilles ved hjelp av kjemisk syntese eller ved hjelp av enzym-

atisk eller kjemisk spalting av fullengde- eller variant-*mpl*-ligandpolypeptidet. Andre typer av kovalente modifikasjoner av *mpl*-liganden eller fragmentene derav innføres i molekylet ved å omsette målrettede aminosyrerester fra *mpl*-liganden eller
 5 fragmenter derav med et organisk derivatiseringsmiddel som er i stand til å reagere med utvalgte sidekjeder eller N- eller C-enderestene.

Cysteinyldrester omsettes vanligvis med α -halogenacetater (og tilsvarende aminer), slik som kloreddiksyre eller
 10 kloracetamid, hvorved man får karboksymetyl- eller karboksyamidometylderivater. Cysteinyldrester derivatiseres også ved omsetning med bromtrifluoraceton, α -brom- β -(5-imidazolyl)propionylsyre, kloracetylfosfat, N-alkylmaleimider, 3-nitro-2-pyridyldisulfid, metyl-2-pyridyldisulfid, p-klormerkuri-
 15 benzoat, 2-klormerkuri-4-nitrofenol eller klor-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol.

Histidylrester derivatiseres ved omsetning med dietylpyrokarbonat ved pH 5,5-7,0 ettersom dette midlet er forholdsvis spesifikt for histidylsidekjeden. Parabromfenacyl-
 20 bromid kan også anvendes, og omsetningen utføres fortrinnsvis i 0,1 M natriumkakodylat ved pH 6,0.

Lysinyl- og aminoenderester omsettes med ravsyre- eller andre karboksylsyreanhydrider. Derivatisering med disse midlene har den effekt at det reverserer ladningen til lysinylrestene. Andre egnede reagenser for derivatisering av amino-
 25 holdige rester omfatter imidoestere, slik som metylpikolinimidat, pyridoksalfosfat, pyridoksal, klorborhydrid, trinitrobenzensulfonsyre, O-metylisourea, 2,4-pentandion og transaminasekatalysert omsetning med glyoksylat.

Arginylrester modifiseres ved omsetning med ett eller flere vanlige reagenser, blant dem fenylglyoksal, 2,3-butan-
 30 dion, 1,2-sykloheksandion og ninhydrin. Derivatisering av argininrester krever at reaksjonen utføres ved alkaliske betingelser på grunn av den høye pK_a til den funksjonelle guanidin-
 35 gruppen. Dessuten kan disse reagensene reagere med gruppene i lysin samt argininets epsilon-aminogruppe.

Den spesifikke modifikasjon av tyrosylrester kan gjøres med særlig interesse i å innføre spektralmarkører i

tyrosylrester ved omsetning med aromatiske diazoniumforbindelser eller tetranitrometan. Mest vanlig anvendes N-acetylimidazol og tetranitrometan til å danne henholdsvis O-acetyltyrosylarter og 3-nitroderivater. Tyrosylrester joderes under anvendelse av ^{125}I eller ^{131}I for å fremstille merkede proteiner for anvendelse ved radioimmunologisk analyse, idet kloramin T-metoden beskrevet ovenfor, er egnet.

Karboksy侧degrupper (aspartyl eller glutamyl) modifieres selektivt ved omsetning med karbodiimider ($\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$) hvor R og R' er forskjellige alkylgrupper, slik som 1-sykloheksyl-3-(2-morfolinyl-4-etyl)karbodiimid eller 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpenlyl)karbodiimid. Dessuten omdannes aspartyl- og glutamylrester til asparaginyll- og glutaminyllrester ved omsetning med ammoniumioner.

Derivatisering med bifunksjonelle midler kan anvendes til kryssbinding av *mpl*-ligand til en vannuoppløselig bærer-matriks eller overflate for anvendelse ved fremgangsmåten til rensing av anti-*mpl*-ligandantistoffer, og omvendt. Vanlig brukte kryssbindingsmidler omfatter f.eks. 1,1-bis(diazoacetyl)-2-fenyletan, glutaraldehyd, N-hydroksysuccinimidestere, f.eks. estere med 4-azidosalisylsyre, homobifunksjonelle imidoestere, inkludert disuccinimidylestere, slik som 3,3'-ditiobis(succinimidylpropionat), og bifunksjonelle maleimider, slik som bis-N-maleimido-1,8-oktan. Derivatiseringsmidler slik som metyl-3-[(p-azidofenyl)ditio]propioimidat, gir lysaktiverbare mellomprodukter som er i stand til å danne kryssbindinger i nærvær av lys. Alternativt anvendes reaktive, vannuoppløselige matrikser, slik som cyanbromidaktiverede karbohydrater og de reaktive substratene beskrevet i US patentskrifter nr. 3 969 287, 3 691 016, 4 195 128, 4 247 642, 4 229 537 og 4 330 440, til proteinimmobilisering.

Glutaminyll- og asparaginyllrester deamideres ofte til henholdsvis de tilsvarende glutamyl- og aspartylrester. Disse restene deamideres under nøytrale eller basiske betingelser. Den deamiderte form av disse rester faller innenfor omfanget av denne oppfinnelsen.

Andre modifikasjoner omfatter hydroksylering av prolin og lysin, fosforylering av hydroksylgrupper i seryl- eller

treonylrester, metylering av α -aminogruppene i lysin-, arginin- og histidinsidekjedene (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, s. 79-86 (1983)), acetylering av det N-terminale amin og amidering av en eventuell C-terminal karboksylgruppe.

En annen type av kovalent modifikasjon av *mpl*-ligandpolypeptidet som er inkludert innenfor omfanget av denne oppfinnelsen, omfatter endring av det naturlig forekommende glykosyleringsmønster for polypeptidet. Ved å endre er det ment delering av én eller flere karbohydratrester som finnes i naturlig forekommende *mpl*-ligand, og/eller addering av ett eller flere glykosyleringsseter som ikke er til stede i den naturlig forekommende *mpl*-ligand.

Glykosylering av polypeptider er vanligvis enten N-bundet eller O-bundet. N-bundet henviser til festingen av karbohydratresten til sidekjeden i en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er hvilken som helst aminosyre bortsett fra prolin, er gjenkjennelsessekvensene for enzymatisk festing av karbohydratresten til asparaginsidekjeden. Tilstedeværelsen av én av disse tripeptidsekvensene i et polypeptid skaper således et potensielt glykosyleringssete. O-bundet glykosylering henviser til festingen av ett av sukrene N-acetylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksyaminosyre, mest vanlig serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

Addisjon av glykosyleringsseter til *mpl*-ligandpolypeptidet utføres passende ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder én eller flere av de ovenfor beskrevne dipeptidsekvenser (for N-bundne glykosyleringsseter). Endringen kan også gjøres ved addisjon av, eller utbytting av, én eller flere serin- eller treoninrester i den naturlig forekommende *mpl*-ligandsekvens (for O-bundne glykosyleringsseter). For lettvinthets skyld endres *mpl*-ligandaminosyresekvensen fortrinnsvis gjennom endringer i DNA-nivået, særlig ved å mutere den DNA som koder for *mpl*-ligandpolypeptidet i forut valgte baser, slik at kodoner frembringes som vil translatere til de ønskede aminosyrer. DNA-mutasjonen(e) kan gjøres ved å bruke

fremgangsmåter som er beskrevet ovenfor under overskriften "Aminosyresekvensvarianter av *mpl*-ligand".

Et annet middel for å øke antallet karbohydratrester på *mpl*-liganden er ved hjelp av kjemisk eller enzymatisk kobling av glykosider til polypeptidet. Disse fremgangsmåtene er fordelaktige ved at de ikke krever fremstilling av polypeptidet i en vertscelle som har glykosyleringsevner for N- eller O-bundet glykosylering. Avhengig av koblingsmåten som brukes, kan sukkeret eller sukrene festes til (a) arginin og histidin, (b) frie karboksylgrupper, (c) frie sulfhydrylgrupper, slik som de i cystein, (d) frie hydroksylgrupper, slik som de i serin, treonin eller hydroksyprolin, (e) aromatiske rester, slik som de i fenylalanin, tyrosin eller tryptofan, eller (f) amidgruppen i glutamin. Disse fremgangsmåtene er beskrevet i WO 87/05330 publisert 11. september 1987, og i Aplin og Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., s. 259-306 (1981).

Fjerning av karbohydratrester som er til stede på *mpl*-ligandpolypeptidet, kan utføres kjemisk eller enzymatisk. Kjemisk deglykosylering krever eksponering av polypeptidet mot forbindelsen trifluormetansulfonsyre eller en ekvivalent forbindelse. Denne behandlingen resulterer i spaltingen av de fleste eller alle sukrene, bortsett fra bindingssukkeret (N-acetylglukosamin eller N-acetylgalaktoamin), mens polypeptidet forblir intakt. Kjemisk deglykosylering er beskrevet av Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) og av Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). Enzymatisk spalting av karbohydratrester på polypeptider kan oppnås ved bruken av mange forskjellige endo- og eksoglykosidaser, som beskrevet av Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Glykosylering av potensielle glykosyleringsseter kan forhindres ved bruk av forbindelsen tunikamycin som beskrevet av Duskin et al., J. Biol. Chem., 257:3105 (1982). Tunikamycin blokkerer dannelsen av protein-N-glykosidbindinger.

En annen type av kovalent modifikasjon av *mpl*-ligand omfatter binding av *mpl*-ligandpolypeptidet til én av mange forskjellige, ikke-proteinholdige polymerer, f.eks. polyetylenglykol, polypropylenglykol eller polyoksyalkylener, på måten angitt i US patentskrifter nr. 4 640 835, 4 496 689,

4 301 144, 4 670 417, 4 791 192 eller 4 179 337. *Mpl*-ligandpolypeptider som er kovalent bundet til de ovenfor nevnte polymerer, henvises her til som pegylerte *mpl*-ligandpolypeptider.

5 Det vil forstås at det vil være behov for en viss screening av den utvundne *mpl*-ligandvariant for å velge ut den optimale variant for binding til en *mpl*, og som har den immunologiske og/eller biologiske aktivitet definert ovenfor. Man kan screene med hensyn på stabilitet i rekombinant celle-
10 kultur eller i plasma (f.eks. mot proteolytisk spalting), høy affinitet mot et *mpl*-medlem, oksidativ stabilitet, evne til å bli utskilt i forhøyede utbytter, og lignende. For eksempel måles en endring i den immunologiske karakter til *mpl*-ligandpolypeptidet, slik som affinitet for et bestemt antistoff, ved
15 hjelp av en immunologisk analyse av kompetitiv type. Andre potensielle modifikasjoner av protein- eller polypeptidegenskaper, slik som redox- eller varmestabilitet, hydrofobisitet eller ømfintlighet for proteolytisk nedbrytning, analyseres ved hjelp av fremgangsmåter som er godt kjent innen teknikken.

20

17. Generelle fremgangsmåter for fremstilling av anti-
stoffer mot *mpl*-ligand

Antistofffremstilling

(i) Polyklonale antistoffer

25 Polyklonale antistoffer mot *mpl*-ligandpolypeptider eller fragmenter derav frembringes generelt i dyr ved hjelp av flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av *mpl*-liganden og et adjuvans. Det kan være nyttig å konjugere *mpl*-liganden eller et fragment som inneholder målaminosyresekvensen, til et protein som er immunogent i artene som
30 skal immuniseres, f.eks. "keyhole limpet"-hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyabønnetrypsininhibitor under anvendelse av et bifunksjonelt eller derivatisert middel, f.eks. maleimidobenzoylsulfosuccinimidester (konjugasjon
35 gjennom cysteinrester), N-hydroksysuccinimid (gjennom lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid, SOCl_2 eller $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, hvor R og R^1 er forskjellige alkylgrupper.

Dyr immuniseres mot *mpl*-ligandpolypeptidet eller

fragmentet, immunogene konjugater eller derivater ved å kombinere 1 mg eller 1 µg av peptidet eller konjugatet (for henholdsvis kaniner og mus) med 3 volumdeler Freund's komplette adjuvans, og injisere oppløsningen intradermalt på flere steder. 1 måned senere forsterkes dyrene med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengde peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvans ved hjelp av subkutan injeksjon på flere steder. 7 til 14 dager senere tas det blodprøve av dyrene, og serumet analyseres med hensyn på *mpl*-ligandantistofftiter.

Dyrene får forsterkningsinjeksjoner inntil titeren flater ut. Fortrinnsvis får dyret forsterkningsinjeksjon med konjugatet av den samme *mpl*-ligand, men til et annet protein og/eller gjennom et annet kryssbindingsreagens. Konjugater kan også lages i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner. Aggregasjonsmidler, slik som alun, anvendes også til å forsterke immunresponsen.

(ii) Monoklonale antistoffer

Monoklonale antistoffer fås fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. de individuelle antistoffene som utgjør populasjonen, er identiske, bortsett fra mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Angivelsen "monoklonalt" indikerer således antistoffets karakter av ikke å være en blanding av forskjellige antistoffer.

For eksempel kan de monoklonale *mpl*-ligandantistoffene ifølge oppfinnelsen lages ved å anvende hybridometoden som først ble beskrevet av Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975), eller kan lages ved hjelp av metoder med rekombinant DNA (US patentskrift nr. 4 816 567 (Cabilly et al.)).

Ved hybridometoden immuniseres en mus eller et annet passende vertsdyr, slik som hamster, som beskrevet ovenfor, slik at det utløses lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt vil binde til proteinet som brukes til immunisering. Alternativt kan lymfocytter immuniseres *in vitro*. Lymfocytter fusjoneres så med myelomceller under anvendelse av et egnet fusjoneringsmiddel, slik som polyetylglykol, hvorved det dannes en hybridomcelle

(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, s. 59-103 (Academic Press, 1986)).

De således fremstilte hybridomceller inokuleres og dyrkes i et egnet dyrkningsmedium som fortrinnsvis inneholder
5 ett eller flere stoffer som inhiberer veksten av eller over-
levelsen til de ufusjonerte opphavsmyelomceller. Dersom f.eks.
opphavsmyelomcellene mangler enzymet hypoksantinguanosinfosfo-
ribosyltransferase (HGPRT eller HPRT), vil dyrkningsmediet for
hybridomene vanligvis omfatte hypoksantin, aminopterin og
10 tymidin (HAT-medium), stoffer som forhindrer veksten av HGPRT-
manglende celler.

Foretrukne myelomceller er de som fusjonerer effek-
tivt, understøtter stabil høynivåekspresjon av antistoff ved
hjelp av de utvalgte antistoffproduserende celler, og som er
15 følsomme for et medium, slik som HAT-medium. Blant disse er
foretrukne myelomcellelinjer murine myelomlinjer, slik som de
som er avledet fra MOPC-21- og MPC-11-musetumorer som er til-
gjengelige fra Salk Institute Cell Distribution Center, San
Diego, California, USA, og SP-2-celler tilgjengelige fra
20 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.
Humanmyelom- og muse-humanheteromyelomcellelinjer er også
blitt beskrevet for fremstillingen av humane, monoklonale an-
tistoffer (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et
al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Appli-
25 cations, s. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).

Kulturmedium hvor hybridomceller vokser, analyseres
med hensyn på produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot
mpl-ligand. Fortrinnsvis bestemmes bindingsspesifisiteten til
monoklonale antistoffer fremstilt av hybridomceller ved hjelp
30 av immunutfelling eller ved hjelp av en bindingsanalyse *in*
vitro, slik som radioimmunologisk analyse (RIA) eller enzym-
bundet immunoabsorpsjonsanalyse (ELISA).

Bindingsaffiniteten til det monoklonale antistoff kan
f.eks. bestemmes ved hjelp av Scatchard-analysen til Munson &
35 Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Etter at det er identifisert hybridomceller som pro-
duserer antistoffer med den ønskede spesifisitet, affinitet
og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved hjelp av frem-

gangsmåter med begrensende fortynning og dyrkes ved hjelp av standardmetoder (Goding, *supra*). Egnede dyrkningsmedier for dette formål omfatter f.eks. Dulbeccos modifiserte Eagles medium eller RPMI 1640-medium. I tillegg kan hybridomceller
5 dyrkes *in vivo* som ascitestumorer i et dyr.

De monoklonale antistoffene utskilt ved hjelp av subklonene, separeres passende fra dyrkningsmediet, ascitesvæsken eller serumet ved hjelp av vanlige immunglobulinrensingsfremgangsmåter, som f.eks. protein A-"Sepharose", hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.
10

DNA som koder for de monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen, isoleres lett og sekvenseres ved å anvende vanlige fremgangsmåter (f.eks. ved å anvende oligonukleotidprober
15 som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for tung- og lettkjedene i murine antistoffer). Hybridomcellene ifølge oppfinnelsen tjener som en foretrukket kilde for slik DNA. Når den først er isolert, kan DNA-en plasseres i ekspressjonsvektorer som så transfekteres i vertsceller, slik som
20 ape-COS-celler, ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler) eller myelomceller som ikke ellers produserer immunglobulinprotein, for å oppnå syntese av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. DNA-en kan også modifiseres f.eks. ved å bytte ut den kodende sekvens med humane, konstante tung-
25 og lettkjededomener for de homologe, murine sekvenser, (Cabilly et al., *supra*; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), eller ved kovalent å knytte hele eller en del av den kodende sekvens for et ikke-immunglobulinpolypeptid til den immunglobulinkodende sekvens.

Vanligvis erstatter slike ikke-immunglobulinpolypeptider de konstante domenene i et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller de erstatter de variable domenene i ett antigenkombinerende sete i et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvorved det skapes et kimært, toverdig antistoff som omfatter et antigen-
35 kombinerende sete med spesifisitet for en *mpl*-ligand, og et annet antigenkombinerende sete med spesifisitet for et forskjellig antigen.

Kimær- eller hybridantistoffer kan også fremstilles

in vitro ved å anvende kjente fremgangsmåter innen syntetisk proteinkjemi, inkludert de som omfatter kryssbindingsmidler. For eksempel kan immuntoksiner konstrueres under anvendelse av en disulfidutbyttingsreaksjon eller ved å danne en tioeterbinding. 5 Eksempler på egnede reagenser for dette formål omfatter iminotiolat og metyl-4-merkaptobutyrimidat.

For diagnostiske anvendelser vil antistoffene ifølge oppfinnelsen vanligvis merkes med en påvisbar rest. Den påvisbare rest kan være hvilken som helst som er i stand til å gi 10 et påvisbart signal, enten direkte eller indirekte. For eksempel kan den påvisbare rest være en radioisotop, slik som ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S eller ^{125}I , en fluorescerende eller kjemiluminescerende forbindelse, slik som fluoresceinisotiocyanat, rhodamin eller luciferin, radioaktive isotopmarkører, slik 15 som f.eks. ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C eller ^3H , eller et enzym, slik som alkalisk fosfatase, beta-galaktosidase eller pepperrotperoksidase.

Enhver fremgangsmåte som er kjent innen teknikken for separat å konjugere antistoffet til den påvisbare rest, kan 20 anvendes, inkludert de fremgangsmåtene som er beskrevet av Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); og Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).

25 Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i hvilken som helst kjent analysefremgangsmåte, slik som kompetitive bindingsanalyser, direkte og indirekte sandwichanalyser og immunutfellingsanalyser. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, s. 147-158 (CRC Press, 30 Inc., 1987).

Kompetitive bindingsanalyser er basert på evnen til en merket standard (som kan være en *mpl*-ligand eller en immunologisk reaktiv del derav) til å konkurrere med testprøveanalytten (*mpl*-ligand) med hensyn på binding med en begrenset mengde antistoff. Mengden av *mpl*-ligand i testprøven 35 er omvendt proporsjonal med mengden av standard som blir bundet til antistoffene. For å lette bestemmelse av mengden av standard som blir bundet, oppløseliggjøres antistoffene

generelt før eller etter konkurransen slik at standarden og analytten som er bundet til antistoffene, lett kan separeres fra standarden og analytten som forblir ubundet.

Sandwichanalyser omfatter bruken av to antistoffer
 5 som hvert er i stand til å binde til en annen immunogen del, eller epitop, i proteinet (*mpl*-ligand) som skal påvises. Ved en sandwichanalyse bindes testprøveanalytten ved hjelp av et første antistoff som er immobilisert på en fast bærer, og deretter bindes et andre antistoff til analytten slik at det dannes et uoppløselig, tredelt kompleks. David & Greene, US
 10 patentskrift nr. 4 376 110. Det andre antistoffet kan selv være merket med en påvisbar rest (direkte sandwichanalyser) eller kan måles ved å bruke et anti-immunglobulin-antistoff som er merket med en påvisbar rest (indirekte sandwichanalyse). For eksempel er én type sandwichanalyse en ELISA-analyse, i hvilket tilfelle den påvisbare rest er et enzym
 15 (f.eks. pepperrotperoksidase).

(iii) Humaniserte og humane antistoffer

20 Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer er velkjente innen teknikken. Generelt har et humanisert antistoff fått innført én eller flere aminosyrerester fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene er ofte henvist til som "import"-rester som vanligvis tas fra
 25 et variabelt "import"-domene. Humanisering kan hovedsakelig utføres ved å følge fremgangsmåten til Winter og medarbeidere (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) ved å sette inn rotte-CDR-er eller CDR-sekvenser til erstatning for de tilsvarende sekvenser i et
 30 humant antistoff. Slike "humaniserte" antistoffer er følgelig kimære antistoffer (Cabilly et al., *supra*) hvor i det vesentlige mindre enn et intakt, variabelt humandomene er blitt erstattet av den tilsvarende sekvens fra en ikke-human art. I
 35 praksis er humaniserte antistoffer vanligvis humanantistoffer hvor noen CDR-rester og eventuelt noen FR-rester er erstattet med rester fra analoge steder i rotteantistoffer.

Valget av variable humandomener, både lette og tunge,

som skal anvendes ved fremstilling av de humaniserte antistoffer, er svært viktig for å redusere antigenisitet. I henhold til den såkalte "best-fit"-metoden screenes sekvensen til det variable domene i et rotteantistoff mot hele biblioteket av kjente, humane, variable domenesekvenser. Humansekvensen som er nærmest opp til rottens, aksepteres så som humanrammen (FR) for det humaniserte antistoff (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia og Lesk, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). En annen fremgangsmåte gjør bruk av en særlig ramme avledet fra konsensussekvensen til alle humane antistoffer i en bestemt undergruppe av lette eller tunge kjeder. Den samme rammen kan brukes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2624 (1993)).

Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med bibeholdelse av høy affinitet til antigenet og andre gunstige, biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet fremstilles i henhold til en foretrukket fremgangsmåte humaniserte antistoffer ved hjelp av en fremgangsmåte for analyse av opphavssekvensene og forskjellige konseptuelle, humaniserte produkter under anvendelse av tredimensjonale modeller for opphavs- og de humaniserte sekvenser. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er allment tilgjengelige og er godt kjent for fagfolk innen teknikken. Datamaskinprogrammer er tilgjengelige som illustrerer og viser sannsynlige tredimensjonale, konformasjonelle strukturer for utvalgte kandidatimmunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse fremvisningene muliggjør analyse av den sannsynlige rolle til restene i virkningen av kandidatimmunglobulinsekvensen, dvs. analysen av rester som påvirker kandidatimmunglobulinets evne til å binde sitt antigen. På denne måte kan FR-rester velges ut og kombineres fra konsensus- og "import"-sekvensen slik at den ønskede antistoffkarakteristikk, slik som forøkt affinitet for målantigenet eller -antigenene, oppnås. Generelt er CDR-restene direkte og svært involvert i påvirkning av antigenbinding. For nærmere detaljer, se US patentsøknad nr. 07/934 373 innlevert 21. august 1992, som er en "continuation-in-part" av US patentsøknad nr. 07/715 272 innlevert 14. juni 1991.

Alternativt er det nå mulig å fremstille transgene dyr (f.eks. mus) som, etter immunisering, er i stand til å produsere et helt repertoar av humanantistoffer i fravær av endogen immunglobulinproduksjon. For eksempel er det blitt
 5 beskrevet at den homozygote delesjon av antistoffets tunge kjede som binder sammen område(J_H)-genet hos kimære og kjønnsellelinjemutante mus, resulterer i komplett inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av humankjønnsellelinjeimmunglobulingenrekken hos slike kjønnsellelinje-
 10 mutante mus vil resultere i produksjonen av humanantistoffer etter antigenutfordring. Se f.eks. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993). Humanantistoffer kan også produseres i
 15 fagfremvisningsbiblioteker (Hoogenboom og Winter, J. Mol. Biol., 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 581 (1991)).

(iv) Bispesifikke antistoffer

20 Bispesifikke antistoffer er monoklonale, fortrinnsvis humane eller humaniserte, antistoffer som har bindingsspesifisiteter for minst to forskjellige antigener. Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjent innen teknikken.

25 Tradisjonelt sett er den rekombinante produksjon av bispesifikke antistoffer basert på samekspresjonen av to immunglobulin-tungkjede-lettkjede-par hvor de to tungkjedene har forskjellige spesifisiteter (Millstein og Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). På grunn av den vilkårlige klassifisering
 30 av immunglobulin-tung- og -lettkjeder produserer disse hybridomene (kvadromene) en potensiell blanding med 10 forskjellige antistoffmolekyler, hvorav bare ett har den korrekte, bispesifikke struktur. Rensingen av det korrekte molekyl som vanligvis gjøres ved hjelp av affinitetskromatografitrinn, er ganske
 35 tungvint, og produktutbyttene er lave. Lignende fremgangsmåter er beskrevet i PCT publikasjonsnr. WO 93/08829 (publisert 13. mai 1993) og i Traunecker et al., EMBO, 10:3655-3659 (1991).

I henhold til en annen og mer foretrukket fremgangsmåte fusjoneres variable antistoffdomener med de ønskede bindingsspesifisiteter (antistoff-antigen-kombinerende seter) til immunglobulin-konstantdomenesekvenser. Fusjonen skjer fortrinnsvis med et immunglobulin-tungkjede-konstantdomene, omfattende minst en del av hengselsområdene CH2 og CH3. Det er foretrukket å ha det første tungkjede-konstantområde (CH1) som inneholder setet som er nødvendig for lettkjedebinding, til stede i minst én av fusjonene. DNA-er som koder for immunglobulintungkjedefusjonene, og om ønsket, immunglobulinlettkjeden, innføres i separate ekspresjonsvektorer og samtransfekteres i en egnet vertsorganisme. Dette sørger for stor fleksibilitet ved regulering av de gjensidige egenskapene til de tre polypeptidfragmentene ved utførelsesformer når ulike forhold mellom de tre polypeptidkjedene som anvendes ved konstruksjonen, gir de optimale utbytter. Det er imidlertid mulig å innføre de kodende sekvenser for to eller alle tre polypeptidkjedene i én ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like mengdeforhold resulterer i høye utbytter, eller når forholdene ikke er av særlig signifikans. Ved en foretrukket utførelsesform av denne fremgangsmåten er de bispesifikke antistoffene sammensatt av en hybridimmunglobulin-tungkjede med en første bindingsspesifisitet i én arm, og et hybridimmunglobulin-tungkjede-lettkjede-par (som tilveiebringer en andre bindingsspesifisitet) i den andre armen. Det ble funnet at denne asymmetriske struktur letter separasjonen av den ønskede, bispesifikke forbindelse fra uønskede immunglobulinkjedekombinasjoner, ettersom tilstedeværelsen av en immunglobulin-lettkjede i bare halvparten av det bispesifikke molekyl sørger for en lettvint måte for separasjon. Denne fremgangsmåten er beskrevet i US patentsøknad nr. 07/931 811 innlevert 17. august 1992.

For nærmere detaljer vedrørende frembringelse av bispesifikke antistoffer vises det f.eks. til Suresh et al.,
Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

(v) Heterokonjugatantistoffer

Heterokonjugatantistoffer er også innenfor omfanget

av foreliggende oppfinnelse. Heterokonjugatantistoffer er sammensatt av to kovalent sammenbundne antistoffer. Slike antistoffer er f.eks. blitt foreslått for å målrette immunsystemceller mot uønskede celler (US patentskrift nr. 4 676 980) og
5 til behandling av HIV-infeksjon (PCT-publikasjon nr. WO 91/00360 og WO 92/00373, EP 03089). Heterokonjugatantistoffer kan lages under anvendelse av enhver passende kryssbindingsmetode. Egnede kryssbindingsmidler er velkjente innen teknikken og er beskrevet i US patentskrift nr. 4 676 980, sammen
10 med en rekke kryssbindingsteknikker.

IV. Terapeutisk anvendelse av megakaryocytopoeseprotein-*mpl*-liganden

Den biologisk aktive *mpl*-ligand med hematopoeseeffekt-
15 torfunksjon og som det her er henvist til som et megakaryocytopoeseprotein (TPO), kan anvendes i et sterilt, farmasøytisk preparat eller formulering for å stimulere megakaryocytopoeseprotein- eller trombopoeseaktivitet hos pasienter som lider av trombocytopeni på grunn av forstyrret
20 produksjon, sekvestrering eller forøket ødeleggelse av blodplater. Trombocytopeni-forbundet benmargshypoplasi (f.eks. aplastisk anemi etter kjemoterapi eller benmargstransplantasjon) kan effektivt behandles med forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen, samt slike forstyrrelser som disseminert, intra-
25 vaskulær koagulasjon (DIC), immuntrombocytopeni (inkludert HIV-indusert ITP og ikke-HIV-indusert ITP), kronisk, idiopatisk trombocytopeni, kongenital trombocytopeni, myelodysplasi og trombocytopeni. I tillegg kan disse megakaryocytopoeseproteinene være anvendbare ved behandling av myeloproliferative, trombocytotiske sykdommer samt trombocytose fra betennelsestilstander og jernmangel.

Foretrukne anvendelser av megakaryocytopoeseprotein- eller trombocytopeniprotein (TPO) ifølge denne oppfinnelsen er ved: myelotoksisk kjemoterapi for behandling av leukemi eller
35 faste tumorer, myeloablativ kjemoterapi for autolog eller allogene benmargstransplantasjon, myelodysplasi, idiopatisk, aplastisk anemi, kongenital trombocytopeni og immuntrombocytopeni.

Ytterligere andre forstyrrelser som vanligvis behandles med megakaryocytopoeseproteinene ifølge denne oppfinnelsen, omfatter defekter eller skade på blodplater som skriver seg fra legemidler, forgiftning eller aktivering på kunstige overflater. I disse tilfellene kan de foreliggende forbindelser anvendes til å stimulere "fraskilling" av nye "uskadede" blodplater. For en komplett liste over nyttige anvendelser, se "Bakgrunn" ovenfor, spesielt avsnittene (a)-(f) og referanser som der er angitt.

Megakaryocytopoeseproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes alene eller i kombinasjon med andre cytokiner, hematopoietiner, interleukiner, vekstfaktorer eller antistoffer ved behandling av de ovenfor identifiserte forstyrrelser og tilstander. De foreliggende forbindelser kan således anvendes i kombinasjon med annet protein eller peptid som har trombopoeseseaktivitet, inkludert G-CSF, GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-1, IL-3, erythropoietin (EPO), sett-ligand, IL-6 og IL-11.

Megakaryocytopoeseproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles i en blanding med en farmasøytisk akseptabel bærer. Dette terapeutiske preparat kan administreres intravenøst eller gjennom nese eller lunge. Preparatet kan også administreres parenteralt eller subkutan etter ønske. Når det administreres systemisk, bør det terapeutiske preparat være pyrogenfritt, og i en parenteralt akseptabel oppløsning med nøye hensyn til pH, isotonsitet og stabilitet. Disse betingelsene er kjent for fagfolk innen teknikken. I korte trekk fremstilles doseringspreparater av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse for lagring eller administrering ved å blande forbindelsen som har den ønskede grad av renhet, med fysiologisk akseptable bærere, eksipienser eller stabiliseringsmidler. Slike materialer er ikke-toksiske for mottakerne ved de doseringer og konsentrasjoner som anvendes, og omfatter slike buffere som fosfat-, sitrat-, acetat- og andre organiske syresalter; antioksidanter, slik som askorbinsyre; peptider med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 rester), slik som polyarginin, proteiner, slik som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner; hydrofile polymerer, slik som polyvinylpyr-

rolidinon; aminosyrer, slik som glysin, glutaminsyre, asparaginsyre eller arginin; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater, inkludert cellulose eller dens derivater, glukose, mannose eller dekstriner; chelateringsmidler, slik
5 som EDTA; sukkeralkoholer, slik som mannitol eller sorbitol; motioner, slik som natrium og/eller ikke-ioniske, overflateaktive midler, slik som "Tween", "Pluronic" eller polyetylen-glykol.

Ca. 0,5 til 500 mg av en forbindelse eller blanding
10 av megakaryocytopoeseproteinet som den frie syre eller baseform, eller som et farmasøytisk akseptabelt salt, blandes med en fysiologisk akseptabel vehikkel, bærer, eksipiens, bindemiddel, conserveringsmiddel, stabiliseringsmiddel, smaksstoff, etc., slik det kreves av godkjent, farmasøytisk praksis.
15 Mengden av aktiv bestanddel i disse preparatene er slik at det oppnås en egnet dosering i det angitte område.

Sterile preparater for injeksjon kan formuleres i henhold til vanlig farmasøytisk praksis. For eksempel kan det være ønsket med oppløsning eller suspensjon av den aktive for-
20 bindelse i en slik vehikkel som vann, eller naturlig forekommende vegetabilsk olje som sesam-, peanøtt- eller bomullsfrøolje, eller en syntetisk fettvehikkel, som etyloleat eller lignende. Buffere, conserveringsmidler, antioksidanter og lignende kan inkorporeres i henhold til godkjent farmasøytisk
25 praksis.

Egnede eksempler på preparater med langvarig frigjørelse omfatter halvpermeable matrikser av faste, hydrofobe polymerer som inneholder polypeptidet, hvor matriksene er i form av formede artikler, f.eks. filmer, eller mikrokapsler.
30 Eksempler på matrikser med langvarig frigjørelse omfatter polyestere, hydrogeler (f.eks. poly(2-hydroksyetylmetakrylat) som beskrevet av Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) og Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US patentskrift nr.
35 3 773 919, EP 58 481), kopolymerer av L-glutaminsyre og gamma-etyl-L-glutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), ikke-nedbrytbart etylenvinylacetat (Langer et al., *supra*), nedbrytbar melkesyre-glykolsyre-kopolymerer, slik som

"Lupron Depot" (injiserbare mikrosfærer sammensatt av melkesyre-glykolsyre-kopolymer og leuprolidacetat), og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133 988).

Selv om slike polymerer som etylenvinylacetat og
5 melkesyre-glykolsyre muliggjør frigjørelse av molekyler i over 100 dager, frigjør visse hydrogeler proteiner i kortere tidsrom. Når innkapslede proteiner forblir i kroppen i lang tid, kan de denaturere eller aggregere som et resultat av eksponering mot fuktighet ved 37 °C, noe som resulterer i et tap av
10 biologisk aktivitet og mulige endringer i immunogenisitet. Rasjonelle strategier kan anvises for proteinstabilisering avhengig av mekanismen som er involvert. Dersom f.eks. aggregasjonsmekanismen oppdages å være intermolekylær S-S-bindingsdannelse gjennom disulfidutveksling, kan stabilisering oppnås
15 ved å modifisere sulfhydrylrester, lyofilisering fra sure oppløsninger, kontrollering av fuktighetsinnhold, anvendelse av passende additiver og utvikling av spesifikke polymermatrikspreparater.

Megakaryocytopoeseproteinpreparater med langvarig
20 frigjørelse omfatter også liposomalt innfanget megakaryocytopoeseprotein. Liposomer som inneholder megakaryocytopoeseprotein, fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter som er i og for seg kjente: DE 3 218 121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52 322; EP 36 676; EP
25 88 046; EP 143 949; EP 142 641; japansk patentsøknad 83-118008; US patentskrifter nr. 4 485 045 og 4 544 545; og EP 102 324. Vanligvis er liposomene av den lille (ca. 200-800 Ångstrøm), enlamellære type hvor lipidinnholdet er høyere
30 enn ca. 30 mol% kolesterol, idet det valgte mengdeforhold reguleres for den optimale megakaryocytopoeseproteinterapi.

Doseringen vil bli bestemt av den tilstedeværende lege som tar i betraktning forskjellige faktorer som er kjent for å modifisere virkningen av legemidler, inkludert alvorlig-
35 het og type av sykdom, kroppsvekt, kjønn, kost, administreringstid og -vei, andre medikasjoner og andre relevante, kliniske faktorer. Vanligvis vil det daglige regime ligge i området fra 0,1 til 100 µg/kg kroppsvekt. Fortrinnsvis vil dos-

eringen variere fra 0,1 til 50 $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt. Mer foretrukket vil den innledende dosering variere fra 1 til 5 $\mu\text{g/kg/dag}$. Eventuelt vil doseringsområdet være det samme som området for andre cytokiner, spesielt G-CSF, GM-CSF og EPO. Terapeutisk effektive doseringer kan bestemmes ved fremgangsmåter enten *in vitro* eller *in vivo*.

Eksempler

Uten nærmere beskrivelse menes det at fagfolk innen teknikken kan, ved å anvende den forutgående beskrivelse og de illustrerende eksempler, utføre og utnytte den foreliggende oppfinnelse i dens videste omfang. De følgende arbeidseksempler peker derfor spesifikt ut foretrukne utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse og skal ikke på noen måte anses som begrensende for det gjenværende av beskrivelsen.

Eksempel 1

20 Partiell rensing av den porcine *mpl*-ligand

Blodplatefattig plasma ble samlet opp fra normale og aplastiske, anemiske griser. Grisene ble gjort aplastiske ved bestråling med 900 cGy av total kroppsbestråling under anvendelse av en 4 mEV lineærakselerator. De bestrålte griser fikk intramuskulære injeksjoner av cefazolin i 6-8 dager. Deretter ble deres totale blodvolum fjernet under generell bedøvelse, heparinisert og sentrifugert ved 1 800 x g i 30 minutter for å lage blodplatefattig plasma. Den megakaryocytstimulerende aktivitet ble funnet å være på topp 6 dager etter bestråling.

Aplastisk, porcint plasma erholdt fra bestrålte griser, gjøres 4 M med NaCl og omrøres i 30 minutter ved romtemperatur. Den resulterende utfelling fjernes ved sentrifugering ved 3 800 rpm i en "Sorvall RC3B", og supernatanten fylles på en "Phenyl-Toyopearl"-kolonne (220 ml) ekvilibrert i 10 mM NaPO_4 inneholdende 4 M NaCl. Kolonnen vaskes med denne bufferen inntil A_{280} er $<0,05$ og elueres med dH_2O . Den eluerte proteintopp fortynnes med dH_2O inntil en ledningsevne på 15 mS og fylles på en "Blue-Sepharose"-kolonne ekvilibrert (240 ml)

i PBS. Deretter vaskes kolonnen med 5 kolonnevolumer hver av PBS og 10 mM NaPO₄ (pH 7,4) inneholdende 2 M urea. Proteiner elueres fra kolonnen med 10 mM NaPO₄ (pH 7,4) inneholdende 2 M urea og 1 M NaCl. Den eluerte proteintopp gjøres til 0,01% oktylglukosid(n-oktyl- β -D-glukopyranosid) og 1 mM hver med EDTA og "Pefabloc" (Boehringer Mannheim) og fylles direkte på kolonner med dobbeltbundet CD4-IgG (Capon, D.J. et al., Nature, 337:525-531 (1989)) og *mpl*-IgG-"Ultralink" (Pierce) (se nedenunder). Kolonnen med CD4-IgG (2 ml) fjernes etter at prøven er fylt på og kolonnen med *mpl*-IgG (4 ml) vaskes med 10 kolonnevolumer hver av PBS og PBS inneholdende 2 M NaCl, og det elueres med 0,1 M glysin-HCl, pH 2,25. Fraksjoner samles opp i 1/10 volum 1 M Tris-HCl (pH 8,0).

Analyse av eluerte fraksjoner fra *mpl*-affinitetskolonnen ved hjelp av SDS-PAGE (4-20%, "Novex"-gel) kjørt under reduserende betingelser; avslørte tilstedeværelsen av flere proteiner (fig. 5). Proteiner som sølvfarger med den høyeste styrke, oppløses med tilsynelatende Mr på 66 000, 55 000, 30 000, 28 000 og 14 000. For å bestemme hvilke av disse proteinene som stimulerer proliferasjon av Ba/F3-*mpl*-cellekulturer, ble disse proteinene eluert fra gelen som beskrevet i eksempel 2 nedenunder.

"Ultralink"-affinitetskolonner

10-20 mg *mpl*-IgG eller CD4-IgG i PBS kobles til 0,5 g "Ultralink"-harpiks (Pierce) som beskrevet ved produsentens instruksjoner.

Konstruksjon og ekspresjon av *mpl*-IgG

Et kimærmolekyl som omfatter hele det ekstracellulære domene fra human-*mpl* (aminosyrene 1-491) og Fc-området til et human IgG1-molekyl, ble uttrykt i 293-celler. Et cDNA-fragment som koder for aminosyrene 1-491 i human-*mpl*, ble erholdt ved hjelp av PCR fra et humant megakaryocyt-CMK-celle-cDNA-bibliotek og sekvensert. Et ClaI-sete ble innføyet i 5'-enden og et BstEII-sete i 3'-enden. Dette fragmentet ble klonet oppstrøms for det kodende område i IgG1-Fc i en "Bluescript"-vektor mellom ClaI- og BstEII-setene etter delvis fordøyelse av

PCR-produktet med BstEII på grunn av to andre BstEII-seter som er til stede i den DNA som koder for det ekstracellulære domene til *mpl*. BstEII-setet innført i 3'-enden av *mpl*-PCR-produktet, ble utformet til å ha Fc-området i ramme med *mpl*-ekstracellulærdomenet. Konstruksjonen ble subklonet i pRK5-tkneo-vektor mellom ClaI- og XbaI-setene og transfektert i 293-humanembryonyreceller ved hjelp av kalsiumfosfatmetoden. Cellene ble selektert i 0,4 mg/ml G418, og individuelle kloner ble isolert. *Mpl*-IgG-ekspresjon fra isolerte kloner ble bestemt ved å bruke en human, Fc-spesifikk ELISA. Den beste ekspresjonsklonen hadde et ekspresjonsnivå på 1-2 mg/ml *mpl*-IgG.

Ba/F3-*mpl*-P-uttrykkende celler

En cDNA som tilsvarende hele det kodende område til human-*mpl*-P, ble klonet i pRK5-tkneo som deretter ble linearisert med NotI og transfektert i den IL-3-avhengige cellelinje Ba/F3 ved hjelp av elektroporasjon (1×10^7 celler, 9605F, 250 V). Tre dager senere ble seleksjon startet i nærvær av 2 mg/ml G418. Cellene ble selektert som blandinger, eller individuelle kloner ble beholdt ved begrensende fortykning i 96-brønners plater. Utvalgte celler ble holdt i RPMI inneholdende 15% FBS, 1 mg/ml G418, 20 mM glutamin, 10 mM HEPES og 100 µg/ml "Pen-Strep". Ekspresjon av *mpl*-P i utvalgte kloner ble bestemt ved hjelp av FACS-analyse under anvendelse av polyklonalt anti-*mpl*-P-kanin-antistoff.

Ba/F3-*mpl*-ligandanalyse

Mpl-ligandanalysen ble utført som vist i figur 2. For å bestemme tilstedeværelsen av *mpl*-ligand fra forskjellige kilder, ble *mpl*-P-Ba/F3-cellene sulteføret på IL-3 i 24 timer ved en celletetthet på 5×10^5 celler/ml i en fuktet inkubator ved 37 °C i 5% CO₂ og luft. Etter IL-3-sulting ble cellene platet ut i 96-brønners kulturskåler ved en tetthet på 50 000 celler i 200 µl medium, med eller uten fortynnede prøver, og dyrket i 24 timer i en cellekulturinkubator. 20 µl serumfritt RPMI-medium inneholdende 1 µCi ³H-tymidin, ble tilsatt til hver brønn i minst 6-8 timer. Cellene ble så innhøstet på 96-brønners GF/C-filterplater og vasket 5 ganger med

vann. Filtrene ble tellet i nærvær av 40 µl scintillasjonsvæske ("Microscint 20") i en "Packard Top Count"-teller.

Eksempel 2

Høyrenset porcin-mpl-ligand

5 Gelelueringsprotokoll

Like mengder affinitetsrenset *mpl*-ligand (fraksjon 6 eluert fra *mpl*-IgG-kolonnen) og 2X Laemmli prøvebuffer ble blandet ved romtemperatur uten reduksjonsmiddel og fylt på en "Novex" 4-20% polyakrylamidgel så hurtig som mulig. Prøven var
10 ikke varmet opp. Som en kontroll ble prøvebuffer uten ligand kjørt på et tilgrensende felt. Gelen ble kjørt ved 4-6 °C ved 135 V i omtrent 2 1/4 time. Kjørebufferen var til å begynne med ved romtemperatur. Gelen ble så fjernet fra gelboksen og platen på én side av gelen fjernet.

15 Det ble laget en replika av gelen på nitrocellulose på følgende måte: Et stykke nitrocellulose ble fuktet med destillert vann og forsiktig lagt på toppen av den eksponerte geloverflate slik at luftbobler ble utelukket. Referansemerker ble plassert på nitrocellulosen og gelplaten slik at replikaen
20 etter farging kunne gjenplasseres nøyaktig. Etter omtrent 2 minutter ble nitrocellulosen forsiktig fjernet, og gelen ble innpakket i plastemballasje og plassert i kjøleskapet. Nitrocellulosen ble farget med BioRads gull-totalproteinfarge ved først å riste den i 3 x 10 ml 0,1% "Tween 20" + 0,5 M NaCl +
25 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, i omtrent 45 minutter, etterfulgt av 3 x 10 ml renset vann i 5 minutter. Gullfargen ble så tilsatt og fikk fremkalles inntil båndene i standardene var synlige. Replikaen ble så skyllet med vann, plassert over plastemballasjen på gelen og forsiktig sammenstilt med referansemerkene.
30 Stillingene til "Novex"-standardene ble merket av på gelplaten, og det ble trukket linjer for å indikere avkuttingsstillingene. Nitrocellulosen og plastemballasjen ble så fjernet og gelen kuttet langs de angitte linjer med et skarpt barberblad. Kuttene ble forlenget utover prøvefeltene slik at de
35 kunne brukes til å bestemme stillingene til stykkene når gelen ble farget. Etter at stykkene var fjernet, ble den gjenværende gel sølvfarget, og stillingene til standardene og kuttmerkene ble målt. Molekylvektene som tilsværer kuttstillingene, ble

bestemt ut fra "Novex"-standardene.

De 12 gelstykkene ble plassert i cellene i to BioRad modell 422 elektroelueringsapparater. I cellene ble det brukt membranhylsler med 12-14 K molekylvektsgrense. 50 mM ammonium-
5 bikarbonat + 0,05% SDS (omtrent pH 7,8) var elueringsbuffer. 1 liter buffer ble avkjølt i omtrent 1 time i et kjølerom ved 4-6 °C før bruk. Gelstykker ble eluert ved 10 ma/celle (40 v til å begynne med) i et kjølerom ved 4-6 °C. Eluering tok omtrent 4 timer. Cellene ble så forsiktig fjernet og væsken over
10 fritten fjernet med en pipette. Elueringskammeret ble fjernet og eventuell væske over membranhylsen fjernet med en pipette. Væsken i membranhylsen ble fjernet med en "Pipetman" og tatt vare på. 50 µl aliquoter med rensset vann ble så plassert i hylsen, ristet og fjernet inntil alle SDS-krystallene oppløses.
15 Disse vaskingene ble kombinert med væsken som var tatt vare på ovenfor. Totalt elueringsprøvevolum var 300-500 µl pr. gelstykke. Prøver ble plassert i 10 mm "Spectrapor 4" dialyserør med 12-14 K grense som hadde vært nedsenket i flere timer i rensset vann. De ble dialysert over natten ved 4-6 °C mot
20 600 ml fosfatbufret saltoppløsning (PBS er omtrent 4 mM i kalium) pr. 6 prøver. Bufferen ble erstattet neste morgen og dialyse fortsatt i 2,5 timer. Prøver ble så fjernet fra dialyseposene og plassert i mikrofugerør. Rørene ble plassert på is i 1 time, mikrosentrifugert ved 14 K rpm i 3 minutter og
25 supernatantene forsiktig fjernet fra den utfelte SDS. Supernatantene ble så plassert på is i omtrent 1 time til og mikrosentrifugert igjen i 4 minutter. Supernatantene ble fortynnet i fosfatbufret saltoppløsning og ført til aktivitetsanalysen. Gjenværende prøver ble nedfryst ved -70 °C.

30

Eksempel 3

Porcin-*mpl*-ligandmikrosekvensering

Fraksjon 6 (2,6 ml) fra *mpl*-IgG-affinitetskolonnen ble konsentrert på en "Microcon-10" (Amicon). For å forhindre
35 *mpl*-liganden fra å absorbere til "Microcon" ble membranen skyllet med 1% SDS, og 5 µl 10% SDS ble tilsatt til fraksjon 6. Prøvebuffer (20 µl) 2X ble tilsatt til fraksjon nr. 6 etter "Microcon"-konsentrasjon (20 µl), og totalvolumet (40 µl) ble

fylt på et enkeltfelt i en 4-20% gradient akrylamidgel ("Novex"). Gelen ble kjørt ved å følge "Novex"-protokollen. Gelen ble så ekvilibrert i 5 minutter før elektroblotting i 10 mM 3-(sykloheksylamino)-1-propansulfonsyre(CAPS)-buffer, pH 11,0, inneholdende 10% metanol. Elektroblotting på "Immobilon-PSQ"-membraner (Millipore) ble utført i 45 minutter ved 250 mA konstant strømstyrke i en BioRad "Trans-Blot" overføringscelle (32). PVDF-membranen ble farget med 0,1% "Coomassie Blue R-250" i 40% metanol, 0,1% eddiksyre i 1 minutt og farget i 2-3 minutter med 10% eddiksyre i 50% metanol. De eneste proteinene som var synlige i Mr-området 18 000-35 000 i flekken, hadde Mr på 30 000, 28 000 og 22 000.

Bånd ved 30, 28 og 22 kDa ble underkastet proteinsekvensering. Automatisert proteinsekvensering ble utført på et modell 470A Applied Biosystem sekvenseringsapparat utstyrt med et on-line PTH analyseapparat. Sekvenseringsapparatet ble modifisert til å injisere 80-90% av prøven (Rodriguez, J. Chromatogr., 350:217-225 (1985)). Aceton (~12 µl/l) ble tilsatt til oppløsningsmiddel A for å balansere UV-absorbansen. Elektroblottede proteiner ble sekvensert i "Blott"-beholderen. Topper ble integrert med "Justice Innovation" programvare under anvendelse av "Nelson Analytical 970"-grensesnitt. Sekvensfortolkning ble utført på en "VAX 5900" (Henzel et al., J. Chromatogr., 404:41-52 (1987)). N-terminale sekvenser (under anvendelse av enbokstavskode med ubestemte rester i parentes), og mengde av materiale erholdt (i parenteser), er vist i tabell 2'.

Tabell 2'

Mpl-ligand-aminoendesequenser

30 kDa	[1,8 pmol]					
1	5	10	15	20	25	
(S) P A P P A (C) D P R L L N K L L R D D (H/S) V L H (G) R L						(SEKV. ID NR.30)
28 kDa	[0,5 pmol]					
1	5	10	15	20	25	
(S) P A P P A X D P R L L N K L L R D D (H) V L (H) G R						(SEKV. ID NR.31)
18-22 kDa	[0,5 pmol]					
1	5	10				
X P A P P A X D P R L X (N) (K)						(SEKV. ID NR.32)

Eksempel 4Megakaryocytopoeseanalyse i væskesuspensjon

Humane periferstamceller (PSC) (erholdt fra pasienter som hadde gitt samtykke) ble fortynnet 5 ganger med IMDM-medium (Gibco) og sentrifugert i 15 minutter ved romtemperatur ved 800 x g. Cellepelletene ble på nytt oppslemmet i IMDM og belagt på 60% "Percoll" (densitet 1,077 g/ml) (Pharmacia) og sentrifugert ved 800 x g i 30 minutter. De mononukleære cellene med lav tetthet ble aspirert på grenseflaten og vasket to ganger med IMDM og platet ut ved $1-2 \times 10^6$ celler/ml i IMDM inneholdende 30% FBS (1 ml sluttvolum) i 24-brønners vevskulturklumper (Costar). APP eller mpl-ligand-uttømt APP ble tilsatt til 10% og kulturene dyrket i 12-14 dager i en fuktet inkubator ved 37 °C i 5% CO₂ og luft. Kulturene ble også dyrket i nærvær av 10% APP med 0,5 µg mpl-IgG tilsatt på dagene 0, 2 og 4. APP ble uttømt for mpl-ligand ved å sende APP gjennom en mpl-IgG-affinitetskonne.

For å kvantifisere megakaryocytopoese i disse væskesuspensjonskulturene ble det brukt en modifikasjon av Solberg et al. og anvendt et radioaktivt merket, murint, monoklonalt IgG-antistoff (HP1-1D) mot GPIIb/IIIa (tilveiebrakt av

dr. Nichols, Mayo Clinic). 100 µg HP1-1D (se Grant, B. et al., Blood, 69:1334-1339 (1987)) ble merket radioaktivt med 1 mCi Na¹²⁵I under anvendelse av "Enzymobeads" (BioRad, Richmond, CA) som beskrevet av produsentens instruksjoner. Radioaktivt
 5 merket HP1-1D ble lagret ved -70 °C i PBS inneholdende 0,01% oktylglukosid. Vanlige, spesifikke aktiviteter var 1-2 x 10⁶ cmp/µg (>95% utfelt ved hjelp av 12,5% trikloreddiksyre).

Væskesuspensjonskulturer ble oppstilt in triplo for hvert forsøkspunkt. Etter 12-14 dager i kultur ble de 1 ml
 10 store kulturene overført til 1,5 ml eppendorf-rør og sentrifugert ved 800 x g i 10 minutter ved romtemperatur, og de resulterende cellepellets ble på nytt oppslemmet i 100 µl PBS inneholdende 0,02% EDTA og 20% bovint kalveserum. 10 ng ¹²⁵I-HP1-1D i 50 µl analysebuffer ble tilsatt til de på nytt oppslemmede
 15 kulturer, og det ble inkubert i 60 minutter ved romtemperatur (RT) med vilkårlig risting. Deretter ble celler samlet opp ved sentrifugering ved 800 x g i 10 minutter ved RT, og det ble vasket to ganger med analysebuffer. Pelletene ble tellet i 1 minutt i en gammateller (Packard). Ikke-spesifikk binding
 20 ble bestemt ved å tilsette 1 µg umerket HP1-1D i 60 minutter før tilsetningen av merket HP1-1D. Spesifikk binding ble bestemt som det totale ¹²⁵I-HP1-1D bundet minus det som ble bundet i nærvær av overskudd av umerket HP1-1D.

25 Eksempel 5

Oligonukleotid-PCR-primere

Basert på den aminoterminal aminosyresekvens erholdt fra de 30 kDa, 28 kDa og 18-22 kDa store proteiner, ble degenererte oligonukleotider utformet for bruk som polymerasekjede-
 30 reaksjonsprimere (PCR-primere) (se tabell 4). To primerblandinger ble syntetisert, en positiv sense-20-mer-blanding som koder for aminosyrerestene 2-8 (*mpl* 1) og en anti-sense-21-mer-blanding som er komplementær til sekvenser som koder for aminosyrene 18-24 (*mpl* 2).

Tabell 4

Blandinger av degenerert oligonukleotidprimer

5	<i>mpl</i> 1:5' CCN GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (2,048 ganger degenerert) (SEKV. ID NR. 35)
	<i>mpl</i> 2:5' NCC RTG NAR NAC RTG RTC RTC 3' (2,048 ganger degenerert) (SEKV. ID NR. 36)

Porcin-genom-DNA isolert fra porcine, perifere blod-
 10 lymfocytter, ble brukt som templat for PCR. Den 50 µl store
 reaksjonsblanding inneholdt: 0,8 µg porcint genom-DNA i 10 mM
 Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 400
 µM dNTP-er, 1 µM av hver primerblanding og 2,5 enheter *Taq*-
 polymerase. Innledende templatdenaturering skjedde ved 94 °C i
 15 8 minutter etterfulgt av 35 sykluser med 45 sekunder ved
 94 °C, 1 minutt ved 55 °C og 1 minutt ved 72 °C. Sluttsyklusen
 fikk vare i 10 minutter ved 72 °C. PCR-produkter ble separert
 ved hjelp av elektroforese på en 12% polyakrylamidgel og visu-
 alisert ved farging med etidiumbromid. Det ble resonnert med
 20 at dersom den aminoterminal aminosyresekvens ble kodet for av
 et enkeltekson, ville det korrekte PCR-produkt forventes å
 være 69 bp. Et DNA-fragment med denne størrelse ble eluert fra
 gelen og subklonet i pGEMT (Promega). Sekvenser fra tre kloner
 er vist nedenunder i tabell 5.

25

30

Tabell 5

69 bp store porcin-genom-DNA-fragmenter

5	gemT3
	5' <u>CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA</u> CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA
	3'GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTATTG ACGGAGCACT
10	TGACCACGTT CAGCACGGC [69 bp] (SEKV. ID NR. 37)
	<u>ACTGGTGCAA GTCGTGCCG</u> (SEKV. ID NR. 38)
	gemT7
	5' <u>CCAGCACCTC CGGCATGTGA</u> CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA
	3'GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTATTG ACGAAGCACT
15	CGACCACGTC CATCACGGC [69 bp] (SEKV. ID NR. 39)
	<u>GCTGGTGCA GTAGTGCCG</u> (SEKV. ID NR. 40)
	gemT9
	P R L L N K L L R (SEKV. ID
20	NR. 32)
	5' <u>CCAGCACCGCCGGCATGTGACCCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACG</u>
	3' GGTCTGGCGGCCGTACACTGGGGGCTGAGGATTATTGACGAAGCACTGC
	ATCATGTCTATCACGGT 3' (SEKV. ID NR. 41)
25	<u>TAGTACAGATAGTGCCA</u> 5' (SEKV. ID NR. 42)

30 Stillingen til PCR-primerne er angitt ved hjelp av de understrekede baser. Disse resultatene bekrefter den N-terminale sekvens erholdt for aminosyrene 9-17 for de 30 kDa, 28 kDa og 18-22 kDa store proteiner og indikerte at denne sekvens kodes for av et enkeltexon i porcin-DNA.

35

Eksempel 6Humant *mpl*-ligandgen

Basert på resultatene fra eksempel 5, ble et 45-mert

deoksyoligonukleotid kalt pR45, utformet og syntetisert for screening av et genombibliotek. 45-meren hadde den følgende sekvens:

5' GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCG 3'

(SEKV. ID NR. 28)

10 Dette oligonukleotid ble ^{32}P -merket med ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP og T4-kinase og brukt til å screene et humangenom-DNA-bibliotek i λ gem12 under lite strenge hybridiserings- og vaskebetingelser (se eksempel 7). Positive kloner ble plukket ut, plakk rensset og analysert ved restriksjonskartlegging og "southern blotting". Klon nr. 4 ble valgt ut for ytterligere analyse.

15 Et 2,8 kb stort BamHI-XbaI-fragment som hybridiserte til 45-meren, ble subklonet i "pBluescript SK-". Partiell DNA-sekvensering av denne klon ble utført ved å bruke som primere oligonukleotider som er spesifikke for den porcine *mpl*-ligand-DNA-sekvens. Den erholdte sekvens bekreftet at DNA som koder for humanhomologen av porcin-*mpl*-ligand, var blitt isolert. Et 20 EcoRI-restriksjonssete ble påvist i sekvensen, noe som tillot oss å isolere et 390 bp stort EcoRI-XbaI-fragment fra det 2,8 kb store BamHI-XbaI, og å subklone det i "pBluescript SK-".

Begge trådene i dette fragmentet ble sekvensert. 25 Human-DNA-sekvensen og den utledede aminosyresekvens er vist i fig. 9 (SEKV. ID NR. 3 & 4). De forutsagte stillingene til introner i genomsekvensen er også angitt ved hjelp av piler og definerer et putativt ekson ("ekson 3").

Undersøkelse av den forutsagte aminosyresekvens be- 30 krefter at en serinrest er den første aminosyre i den modne *mpl*-ligand slik det ble bestemt ut fra direkte aminosyresekvensanalyse. Umiddelbart oppstrøms for dette kodon tyder den forutsagte aminosyresekvens sterkt på en signalsekvens involvert i utskillelse av den modne *mpl*-ligand. Det kodende område 35 i denne signalsekvens er sannsynligvis avbrutt i nukleotidstilling med et intron.

I 3'-retningen synes eksonet å avsluttes i nukleotid 196. Dette ekson koder derfor for en sekvens med 42 amino-

syrrer, hvorav 16 sannsynligvis er en del av en signalsekvens, og hvorav 26 er en del av den modne human-*mpl*-ligand.

Eksempel 7

5 Fullengde human-*mpl*-ligand-cDNA

Basert på den humane "ekson 3"-sekvens (eksempel 6), ble det syntetisert to ikke-degenererte oligonukleotider som tilsvarende 3'- og 5'-endene av "ekson 3"-sekvensen (tabell 6).

10 Tabell 6

Human-cDNA ikke-degenererte PCR-oligonukleotidprimere

15	Frem- over-primer: 5' GCT AGC TCT AGA AAT TGC TCC TCG TGG TCA TGC TTC T 3'	(SEKV. ID NR. 43)
	Re- vers-primer: 5' CAG TCT GCC GTG AAG GAC ATG G 3'	(SEKV. ID NR. 44)

20 Disse to primerne ble brukt i PCR-reaksjoner under anvendelse av DNA fra forskjellige human-cDNA-biblioteker som templat, eller 1 ng "Quick Clone"-cDNA (Clonotech) fra forskjellige vev, idet betingelsene beskrevet i eksempel 5, ble brukt. Den forventede størrelse til det korrekte PCR-produkt
25 var 140 bp. Etter analyse av PCR-produktene på en 12% polyakrylamidgel ble et DNA-fragment med den forventede størrelse påvist i cDNA-biblioteker fremstilt fra voksennyre, 293-fosternyreceller og cDNA fremstilt fra humanfosterlever (Clonotech katalog nr. 7171-1).

30 Et fosterlever-cDNA-bibliotek i λ DR2 (Clonotech katalog nr. HL1151x) ble screenet med det samme 45-mer-oligonukleotid som ble brukt til å screene humangenombiblioteket. Oligonukleotidet ble merket med (λ^{32} P)-ATP under anvendelse av T4-polynukleotidkinase. Biblioteket ble screenet under lite
35 strenge hybridiseringsbetingelser. Feltene ble forhybridisert i 2 timer og så hybridisert med proben over natten ved 42 °C i 20% formamid, 5xSSC, 10xDenhardts, 0,05 M natriumfosfat (pH 6,5), 0,1% natriumpyrofosfat, 50 µg/ml sonikert laksesperma-

DNA i 16 timer. Filtre ble så skyllet i 2xSSC og så vasket én gang i 0,5xSSC, 0,1% SDS ved 42 °C. Filtre ble eksponert over natten mot Kodak røntgenfilm. Positive kloner ble plukket ut, plakk renses, og innføylesstørrelsen ble bestemt ved hjelp
 5 av PCR under anvendelse av oligonukleotider som flankerer BamHI-XbaI-kloning i λ DR2 (Clonotech katalog nr. 6475-1). Det ble brukt 5 μ l fagstandard som templatkilde. Innledende denaturering skjedde i 7 minutter ved 94 °C etterfulgt av 30 sykluser med amplifikasjon (1 minutt ved 94 °C, 1 minutt
 10 ved 52 °C og 1,5 minutt ved 72 °C). Sluttforlengelse skjedde i 15 minutter ved 72 °C. Kløn nr. FL2b hadde en 1,8 kb stor innføyelse og ble valgt ut for videre analyse.

Plasmidet pDR2 (Clonotech, λ DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, s. 42) som finnes
 15 i λ DR2-fagarmene, ble reddet som beskrevet i produsentens instruksjoner (Clonotech, λ DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, s. 29-30). Restriksjonsanalyse av plasmidet pDR2-FL2b med BamHI og XbaI indikerte tilstedeværelse av et indre BamHI-restriksjonssete i innføyelsen
 20 omtrent i 650-stilling. Fordøyelse av plasmidet med BamHI-XbaI kutter innføyelsen i to fragmenter, ett på 0,65 kb og ett på 1,15 kb. DNA-sekvens ble bestemt med tre forskjellige klasser av templat avledet fra plasmidet pDR2-FL2b. DNA-sekvenser av dobbelttrådet plasmid-DNA ble utført med "ABI373" (Applied
 25 Biosystems, Foster City, California) automatisert fluorescens-DNA-sekvenseringsapparat under anvendelse av standardprotokoller for fargemerke dideoksynukleosidtrifosfatterminatorer (fargeterminatorer) og vanlig syntetiserte vandreprimerer (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467
 30 (1977); Smith et al., Nature, 321:674-679 (1986)). Direkte sekvensering av polymerasekjedereaksjonsamplifiserte fragmenter fra plasmidet ble gjort med ABI373-sekvenseringsapparatet under anvendelse av vanlige primere og fargeterminatorreaksjoner. Enkeltrådet templat ble frembrakt med "M13-
 35 Janus"-vektoren (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) (Burland et al., Nucl. Acids Res., 21:3385-3390 (1993)). BamHI-XbaI- (1,15 kb) og BamHI- (0,65 kb) fragmenter ble isolert fra plasmidet pDR2-FL2b, endene ble igjenfylt med T4-DNA-polymerase i

nårvær av deoksynukleotider og så subklonet i SmaI-setet til "M13-Janus". Sekvensering ble utført med standardprotokoller for fargemerkede M13-universal- og reversprimere, eller vandreprimere og fargeterminatorer. Manuelle sekvenseringsreaksjoner ble utført på enkelttrådet M13-DNA under anvendelse av vandreprimere og standard dideoksyterminatorkjemi (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467 (1977)), ³³P-merket α-dATP og "Sequenase" (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). DNA-sekvenssammenstilling ble utført med "Sequencer V2.1b12" (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Nukleotidet og de utledede sekvenser for hML er angitt i fig. 1 (SEKV. ID NR. 1).

Eksempel 8

15 Isolering av human-mpl-ligandgenet (TPO-genet)

Human-genom-DNA-kloner av TPO-genet ble isolert ved screening av et humangenombibliotek i λ-Gem12 med pR45, en tidligere beskrevet oligonukleotidprobe, under lite strenge betingelser (se eksempel 7) eller under svært strenge betingelser med et fragment tilsvarende 3'-halvdelen av human-cDNA som koder for mpl-liganden (fra BamHI-setet til 3'-enden). To overlappende lambda-kloner som spenner over 35 kb, ble isolert. To overlappende fragmenter (BamHI eller EcoRI) inneholdende hele TPO-genet, ble subklonet og sekvensert. Strukturen til humangenet er sammensatt av 6 eksoner innenfor 7 kb av genom-DNA (figur 14 A, B og C). Grensene til alle ekson/-intron-sammenknytningspunkter er i overensstemmelse med konsensusmotivet som er fastslått for pattedyrgener (Shapiro, M.B. et al., Nucl. Acids Res., 15:7155 (1987)). Ekson 1 og ekson 2 inneholder 5'-utranslatert sekvens og de første fire aminosyrene i signalpeptidet. Det gjenværende av sekretorsignalet og de første 26 aminosyrene i det modne protein er kodet for innenfor ekson 3. Hele karboksylgruppen og det 3'-utranslaterte samt ca. 50 aminosyrer av det erythropoietinlignende domene kodes for innenfor ekson 6. De fire aminosyrene involvert i delesjonen observert i hML-2 (hTPO-2), kodes for i 5'-enden av ekson 6.

Eksempel 9Transient ekspresjon av human-mpl-ligand (hML)

For å subklone fullengdeinnføyelsen inneholdt i pDR2-FL2b, ble plasmidet fordøyd med XbaI inntil fullstendighet, så
 5 partielt fordøyd med BamHI. Et DNA-fragment som tilsvarer den 1,8 kb store innføyelse, ble gelrenset og subklonet i pRK5 (pRK5-hmpl I) (se US patentskrift nr. 5 258 287 for konstruksjon av pRK5) under kontroll av den umiddelbart tidlige promoter fra cytomegalovirus. DNA fra konstruksjonen pRK5-hmpl I
 10 ble fremstilt ved hjelp av PEG-metoden og transfektert i human embryonyre-293-celler opprettholdt i Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) supplert med F-12-næringsblanding, 20 mM HEPES (pH 7,4) og 10% føtalt, bovint serum. Celler ble transfektert ved hjelp av kalsiumfosfatmetoden som beskrevet (Gorman, C. (1985) i DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D.M., red.) vol. II, s. 143-190, IRL Press, Washington, D.C.).
 15 36 timer etter transfeksjon ble supernatanten fra de transfekterte celler analysert med hensyn på aktivitet i proliferasjonsanalysen (se eksempel 1). Supernatant fra 293-celler transfektert med pRK-vektor alene, ga ingen stimulering av Ba/F3- eller Ba/F3-mpl-cellene (fig. 12A). Supernatant fra celler transfektert med pRK5-hmpl I, hadde ingen effekt på Ba/F3-cellene, men stimulerer proliferasjonen av Ba/F3-mpl-celler (fig. 12A) dramatisk, noe som indikerer at denne cDNA
 20 koder for en funksjonelt aktiv human-mpl-ligand.

Eksempel 10Human-mpl-ligandisoformene hML2, hML3 og hML4

For å identifisere alternativt spleisede former av
 30 hML ble det syntetisert primere som tilsvarer hver ende av den kodende sekvens i hML. Disse primerne ble anvendt i RT-PCR for å amplifisere human voksenlever-RNA. I tillegg ble indre primere som flankerer utvalgte områder av interesse (se neden-
 under), konstruert og likeledes anvendt. Direkte sekvensering
 35 av endene til PCR-produktet avslørte en enkeltsekvens som tilsvarer nøyaktig sekvensen til den cDNA som er isolert fra humanfosterleverbiblioteket (se fig. 1 (SEKV. ID NR. 1)). Et område nær C-enden av EPO-domenet (i midten av PCR-produktet)

oppviste imidlertid et komplekssekvensmønster som tyder på eksistensen av mulige spleisevarianter i det området. For å isolere disse spleisevariantene ble primerne tilveiebrakt i tabell 7 som flankerer området av interesse, brukt i en PCR
5 som templat for human voksenlever-cDNA.

Tabell 7
Humane ML-isoform-PCR-primere

phmplcdna.3e1:	5'TGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATG3'	(SEKV. ID NR. 45)
pbx4.f2:	5'GGTCCAGGGACCTGGAGGTTTG3'	(SEKV. ID NR. 46)

15

PCR-produktene ble subklonet butte i M13. Sekvensering av individuelle subkloner avslørte eksistensen av minst 3 ML-isoformer. En av dem, hML (også henvist til som hML₃₃₂), er den lengste formen og tilsvarende nøyaktig sekvensen isolert
20 fra fosterleverbiblioteket. Sekvenser til de fire human-*mpl*-ligandisoformene angitt fra den lengste (hML) til den korteste (hML-4), er angitt i (fig. 11 (SEKV. ID NR. 6, 8, 9 & 10)).

Eksempel 11

25 Konstruksjon og transient ekspresjon av human-*mpl*-ligandisoformene og substitusjonsvariantene hML2, hML3 og hML(R153A, R1514A)

Isoformene hML2 og hML3 og substitusjonsvariant hML(R153A, R154A) ble rekonstruert fra hML under anvendelse av
30 den rekombinante PCR-teknikken beskrevet av Russell Higuchi i PCR Protocols, A guide to Methods and Applications, Acad. Press, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, red.

I alle konstruksjonene er de anvendte, "utvendige"
35 primere vist i tabell 8, og "overlappings"-primerne er vist i tabell 9.

Tabell 8
Utvendige primere

Cla.FL.F2: 5'ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G3'	(SEKV. ID NR. 47)
HMP.LL-R: 5'GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA3'	(SEKV. ID NR. 48)

Tabell 9
Overlappingsprimere

hML-2: MLΔ4.F: 5'CTC CTT GGA ACC CAG GGC AGG ACC 3' MLΔ4.R 5'GGT CCT GCC CTG GGT TCC AAG GAG 3'	(SEKV. ID NR 49) (SEKV. ID NR 50)
hML-3: hMLΔ116+: 5'CTG CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT 3' hMLΔ116-: 5'AAT CCA GAA GTC CTT TCC TCG GAG CAG 3'	(SEKV. ID NR 51) (SEKV. ID NR 52)
hML(R153A, R154A): RR-KO-F: 5'CCC TCT GCG TCG CGG CGG CCC CAC CCA C 3' RR-KO-R: 5'GTG GGT GGG GCC GCC GCG ACG CAG AGG G 3'	(SEKV. ID NR 53) (SEKV. ID NR 54)

Alle PCR-amplifikasjoner ble utført med klonet Pfu-DNA-polymerase (Stratagene) under anvendelse av de følgende betingelser: Initiell templatdenaturering skjedde ved 94 °C i 7 minutter etterfulgt av 30 sykluser med 1 minutt ved 94 °C, 1 minutt ved 55 °C og 1,5 minutt ved 72 °C. Sluttsyklusen fikk vare i 10 minutter ved 72 °C. Slutt-PCR-produktet ble fordøyd med ClaI-XbaI, gelrenset og klonet i pRK5tkneo. 293-celler ble transfektert med de forskjellige konstruksjonene som beskrevet ovenfor, og supernatanten ble analysert under anvendelse av Ba/F3-*mpl*-proliferasjonsanalysen. hML-2 og hML-3 viste ingen

påvisbar aktivitet ved denne analysen, aktiviteten til hML(R153A, R154A) var imidlertid lik hML, noe som indikerer at prosessering på dette tobasiske sted ikke er påkrevet for aktivitet (se fig. 13).

5

Eksempel 12

Murin *mpl*-ligand-cDNA mML, mML-2 og mML-3

Isolering av mML-cDNA

Et DNA-fragment som tilsvarende hele det kodende område i human-*mpl*-liganden, ble erholdt ved hjelp av PCR, gelrenset og merket ved hjelp av vilkårlig priming i nærvær av ^{32}P -dATP og ^{32}P -dCTP. Denne probe ble brukt til å screene 10^6 kloner i et muselever-cDNA-bibliotek i λ GT10 (Clontech katalog nr. ML3001a). Filtre in duplo ble hybridisert i 35% formamid, 10 5xSSC, 10xDenhardts, 0,1% SDS, 0,05 M natriumfosfat (pH 6,5), 0,1% natriumpyrofosfat, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sonikert laksesperma-DNA over natten i nærvær av proben. Filtre ble skyllet i 2xSSC og så vasket én gang i 0,5xSSC, 0,1% SDS ved 42 °C. Hybridiseringsfag ble plakkrenset og cDNA-innføydelsene subklonet i 20 EcoRI-setet i "Bluescript SK-"-plasmid. Klon "LD" med en 1,5 kb stor innføyelse ble valgt for videre analyse, og begge trådene ble sekvensert som beskrevet ovenfor for human-ML-cDNA. Nukleotidet og de utledede aminosyresekvenser fra klon LD er angitt i fig. 14 (SEKV. ID NR. 1 & 11). Den utledede, 25 modne ML-sekvens fra denne klon var 331 aminosyrerester lang og ble identifisert som mML₃₃₁ (eller mML-2 av grunner som er beskrevet nedenunder). Betydelig identitet for både nukleotid- og utledede aminosyresekvenser ble observert i de EPO-lignende domener i disse ML-er. Når utledede aminosyresekvenser for 30 human- og muse-ML-er ble sammenstilt, syntes imidlertid muse-sekvensen å ha en tetrapeptiddelesjon mellom humanrestene 111-114 tilsvarende 12-nukleotiddelesjonen etter nukleotidstilling 618 som ses i både human- (se ovenfor) og grise- (se nedenunder) cDNA-er. Ytterligere kloner ble følgelig undersøkt for 35 å påvise mulige, murine ML-isoformer. Én klon, "L7", hadde en 1,4 kb stor innføyelse med en 335 aminosyrers utledet sekvens inneholdende det "manglende" tetrapeptid LPLQ. Denne formen menes å være fullengdeformen av murin ML og henvises til som

mML eller mML₃₃₅. Nukleotid- og den utledede aminosyresekvens for mML er angitt i fig. 16 (SEKV. ID NR. 12 & 13). Endelig ble klon "L2" isolert og sekvensert. Denne klon har 116-nukleotiddelesjonen som tilsvarende hML3 og er derfor betegnet mML-3. Sammenligning av de utledede aminosyresekvensene for disse to isoformene er vist i fig. 16.

Ekspresjon av rekombinant mML

Ekspresjonsvektorer for murin ML ble fremstilt hovedsakelig som beskrevet i eksempel 8. Kloner som koder for mML og mML-2, ble subklonet i pRK5tkneo, en pattedyrekspresjonsvektor som gir ekspresjon under kontroll av CMV-promoter og et SV40-polyadenyleringssignal. De resulterende ekspresjonsvektorer, mMLpRKtkneo og mML2pRKtkneo, ble transient transfektert i 293-celler under anvendelse av kalsiumfosfatmetoden. Etter transient transfeksjon ble medium kondisjonert i 5 dager. Cellene ble holdt i høyglukose-DMEM-medium supplert med 10% kalvefosterserum.

Ekspresjon av murin-*mpl* (*mmp1*) i Ba/F3-celler

Stabile cellelinjer som uttrykker *c-mpl*, ble erholdt ved transfeksjon av *mmp1*-pRKtkneo, hovedsakelig som beskrevet for human-*mpl* i eksempel 1. I korte trekk ble en ekspresjonsvektor (20 µg, linearisert) inneholdende hele den kodende sekvens for murin-*mpl* (Skoda, R.C. et al., EMBO J., 12:2645-2653 (1993)), transfektert i Ba/F3-celler ved elektroporasjon (5 x 10⁶ celler, 250 V, 960 µF) etterfulgt av utvelgelse med hensyn på neomycinresistens med 2 mg/ml G418. Ekspresjon av *mpl* ble fastslått ved hjelp av strømningscytometrianalyse under anvendelse av kanin-anti-murin-*mpl*-IgG-antisera. Ba/F3-celler ble holdt i RPMI 1640-medium fra WEHI-3B-celler som en kilde for IL-3. Supernatanter fra 293-celler transient transfektert med både mML og mML-2, ble analysert i BaF3-celler transfektert med både *mmp1* og *hmp1* som beskrevet i eksempel 1.

Eksempel 13

Porcin-*mpl*-ligand-cDNA pML og pML-2

Porcin-ML (pML)-cDNA ble isolert ved hjelp av RACE-

PCR. I korte trekk ble en oligo dT-primer og to spesifikke primere utformet basert på sekvensen til eksonet i porcin-ML-genet som koder for aminoenden av den ML som er rensset fra det aplastiske griseserum. cDNA fremstilt fra forskjellige aplastiske grisevev, ble erholdt og amplifisert. Et PCR-cDNA-produkt med 1 342 bp ble funnet i nyre og subklonet. Flere kloner ble sekvensert og funnet å kode for den modne grise-*mpl*-ligand (ikke inkludert i komplett sekresjonssignal). cDNA-en ble funnet å kode for et 332 aminosyrers modent protein (pML₃₃₂) med sekvensen vist i fig. 18 (SEKV. ID NR. 9 & 16).

Metode:

Isolering av pML-gen og cDNA

Genomkloner av porcin-ML-genet ble isolert ved screening av et grisegenombibliotek i EMBL3 (Clontech Inc.) med pR45. Biblioteket ble screenet hovedsakelig som beskrevet i eksempel 7. Flere kloner ble isolert, og eksonet som kodet for aminosyresekvensen som er identisk med den som ble erholdt fra rensset ML, ble sekvensert. Porcin-ML-cDNA ble erholdt under anvendelse av en modifikasjon av RACE-PCR-protokollen. To spesifikke ML-primere ble utformet basert på sekvensen til grise-ML-genet. Polyadenylert mRNA ble isolert fra nyre fra aplastiske griser hovedsakelig som tidligere beskrevet. cDNA ble fremstilt ved hjelp av reverstranskripsjon med BamdT-primeren

(BamdT: 5' GACTCGAGGATCCATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT 3')

(SEKV. ID NR. 55)

rettet mot polyadenosinhalen til mRNA-en. En innledende runde med PCR-amplifikasjon (28 sykluser ved 95 °C i 60 sekunder, 58 °C i 60 sekunder og 72 °C i 90 sekunder) ble utført under anvendelse av den ML-spesifikke h-fremover-1-primer

(h-fremover-1: 5' GCTAGCTCTAGAAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCT 3')

(SEKV. ID NR. 43)

og BAMAD-primeren

(BAMAD: 5' GACTCGAGGATCCATCG 3')

(SEKV. ID NR. 56)

i en 100 ml reaksjonsblanding (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl, 10 mM
 5 Tris, pH 8,0, 0,2 mM dNTP-er, med 0,05 U/ml "Amplitaq"-poly-
 merase (Perkin Elmer Inc.)). PCR-produktet ble så fordøyd med
 ClaI, ekstrahert med fenol og kloroform i forholdet 1:1,
 etanolutfelt og ligert til 0,1 mg "Bluescript SK-"-vektor
 (Stratagene Inc.) som var blitt kuttet med ClaI og KpnI. Etter
 10 inkubasjon i 2 timer ved romtemperatur ble 1/4 av ligerings-
 blandingen tilsatt direkte til en andre runde med PCR (22 syk-
 luser som beskrevet ovenfor) under anvendelse av en andre ML-
 spesifikk fremover-1-primer

15 (fremover-1: 5' GCTAGCTCTAGAAGCCCGGCTCCTCCTGCCTG 3')

(SEKV. ID NR. 57)

og T3-21 (et oligonukleotid som bindes til en sekvens ved
 siden av multippelkloningsområdet i "Bluescript SK-"-vek-
 20 toren):

(5' CGAAATTAACCCTCACTAAAG 3')

(SEKV. ID NR. 58).

25 Det resulterende PCR-produkt ble fordøyd med XbaI og ClaI og
 subklonet i "Bluescript SK-". Flere kloner fra uavhengige PCR-
 reaksjoner ble sekvensert.

Igjen ble en andre form, betegnet pML-2, som koder
 for et protein med en 4 aminosyreresters delesjon (328 amino-
 30 syrerester), identifisert (se fig. 21 (SEKV. ID NR. 21)). Sam-
 menligning av pML- og pML-2-aminosyresekvenser viser at den
 sistnevnte form er identisk, bortsett fra tetrapeptidet QLPP
 som tilsvare restene fra og med 111 til og med 114, er blitt
 delert (se fig. 22 (SEKV. ID NR. 18 & 21)). De fire aminosyre-
 35 delesjonene observert i murin, human og porcin ML-cDNA, opp-
 trer i nøyaktig den samme stilling i de forutsagte proteiner.

Eksempel 14CMK-analyse med hensyn på trombopoietininduksjon (TPO-induksjon) av blodplateantigen GPII_bIII_a-ekspressjon

CMK-celler holdes i RPMI 1640-medium (Sigma) supplert med 10% føtalt, bovint serum og 10 mM glutamin. Ved fremstilling av analysen innhøstes cellene, vaskes og oppslemmes på nytt ved 5×10^5 celler/ml i serumfritt GIF-medium supplert med 5 mg/l bovint insulin, 10 mg/l apotransferrin, 1 x sporelementer. I en 96-brønners, flatbunnet plate tilsettes TPO-standarder eller eksperimentelle prøver til hver brønn ved passende fortyndinger i 100 µl volumer. 100 µl av CMK-cellesuspensjonen tilsettes til hver brønn, og platene inkuberes ved 37 °C i en 5% CO₂-inkubator i 48 timer. Etter inkubasjon sentrifugeres platene ved 1 000 rpm ved 4 °C i 5 minutter. Supernatantene kasseres, og 100 µl av det FITC-konjugerte GPII_bIII_a monoklonale 2D2-antistoff tilsettes til hver brønn. Etter inkubasjon ved 4 °C i 1 time sentrifugeres platene igjen ved 1 000 rpm i 5 minutter. Supernatantene som inneholder ubundet antistoff, kasseres, og 200 µl 0,1% BSA-PBS-vasking tilsettes til hver brønn. Det 0,1% BSA-PBS-vasketrinn gjentas tre ganger. Cellene analyseres så på en "FASCAN" under anvendelse av standard enparameters analyse som måler relativ fluorescensstyrke.

25 Eksempel 15DAMI-analyse med hensyn på trombopoietin (TPO) ved å måle endomitotisk aktivitet av DAMI-celler på 96-brønners mikrotiterplater

DAMI-celler holdes i IMDM + 10% hesteserum (Gibco) supplert med 10 mM glutamin, 100 ng/ml penicillin G og 50 µg/ml streptomycin. Ved fremstilling for analysen innhøstes cellene, vaskes og oppslemmes på nytt ved 1×10^6 celler/ml i IMDM + 1% hesteserum. I en 96-brønners, rundbunnet plate tilsettes 100 µl av TPO-standarder eller de eksperimentelle prøvene til DAMI-cellesuspensjon. Celler inkuberes så i 48 timer ved 37 °C i en 5% CO₂-inkubator. Etter inkubasjon sentrifugeres plater i en "Sorvall 6000B"-sentrifuge ved 1 000 rpm i 5 minutter ved 4 °C. Supernatantene kasseres, og

200 µl PBS-0,1% BSA vasketrinn gjentas. Celler fikseres ved tilsetning av 200 µl iskald 70% etanol-PBS og oppslemmes på nytt ved aspirasjon. Etter inkubasjon ved 4 °C i 15 minutter sentrifugeres platene ved 2 000 rpm i 5 minutter, og 150 µl
 5 1 mg/ml RNase inneholdende 0,1 mg/ml propidiumjodid og 0,05% "Tween-20" tilsettes til hver brønn. Etter 1 times inkubasjon ved 37 °C måles endringene i DNA-innhold ved hjelp av strømningscytometri. Polyploiditet måles og kvantifiseres på følgende måte:

$$\text{Normalisert polyploidforhold (NPR)} = \frac{(\% \text{ celler i } >G2+M / \% \text{ celler i } <G2+M) \text{ med TPO}}{(\% \text{ celler i } >G2+M / \% \text{ celler i } <G2+M) \text{ i kontroll}}$$

15 Eksempel 16

Analyse in vivo av trombopoietin (TPO)

(Analyse av gjenbundet museblodplate)

Analyse in vivo med hensyn på ³⁵S-bestemmelse av blodplateproduksjon

20 C57BL6-mus (erholdt fra Charles River) ble injisert intraperitonealt (IP) med 1 ml geite-anti-muse-blodplateserum (6 amps) på dag 1 for å frembringe trombocytopeni. På dagene 5 og 6 fikk musene to IP-injeksjoner av faktoren eller PBS som kontroll. På dag 7 ble det injisert 30 µCi Na₂³⁵SO₄ i 0,1 ml
 25 saltoppløsning intravenøst, og den prosentvise ³⁵S-inkorporering av den injiserte dose i blodplater i omløp ble målt i blodprøver erholdt fra behandlede og kontrollmus. Blodplate-tellinger og leukocytt-tellinger ble gjort samtidig fra blod erholdt fra bakre del av øyehulen.

30 Eksempel 17

KIRA-ELISA for trombopoietin (TPO) ved å måle fosforylering av *mpl*-Rse.gD-kimærreseptoren

Human-*mpl*-reseptoren er blitt beskrevet av Vigon et al., PNAS, USA, 89:5640-5644 (1992). En kimærreseptor som omfatter det ekstracellulære domene (ECD) i *mpl*-reseptoren og transmembran- (TM) og det intracellulære domene (ICD) i Rse (Mark et al., J. of Biol. Chem., 269(14):10720-10728 (1994))

med et karboksylterminalt flaggpolypeptid (dvs. Rse.gD), ble laget for anvendelse i den her beskrevne KIRA-ELISA. Se figurene 30 og 31 for en diagrambeskrivelse av analysen.

5 (a) Innfangingsmiddelpreparat

Monoklonalt anti-gD (klon 5B6) ble fremstilt mot et peptid fra Herpes simplex-virus-glykoprotein D (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)). Det rensede standardpreparat ble regulert til 3,0 mg/ml i fosfatbufret saltoppløsning (PBS, pH 7,4, og 1,0 ml aliquoter ble lagret ved -20 °C.

(b) Antifosfotyrosin-antistoffpreparat

15 Monoklonalt antifosfotyrosin, klon 4G10, ble innkjøpt fra UBI (Lake Placid, NY) og biotinyllert under anvendelse av langarmet biotin-N-hydroksysuccinamid ("Biotin-X-NHS", Research Organics, Cleveland, OH).

(c) Ligand

20 Mpl-liganden ble fremstilt ved hjelp av de rekombinante teknikker som her er beskrevet. Den rensede mpl-ligand ble lagret ved 4 °C som en standardoppløsning.

(d) Fremstilling av Rse.gD-nukleinsyre

25 Syntetiske, dobbelttrådede oligonukleotider ble brukt til å rekonstruere den kodende sekvens for de C-terminale 10 aminosyrene (880-890) i human-Rse, og det ble addert ytterligere 21 aminosyrer inneholdende en epitop for antistoffet 5B6 og et stoppkodon. Tabell 10 viser sluttsekvensen til den
30 syntetiske delen av fusjonsgenet.

Tabell 10

Syntetisk, dobbelttrådet del av human-Rse-fusjons-gen

5	kodende tråd: 5'-TGCAGCAAGGGCTACTGCCACACTCGAGCTGCGCAGATGCTAGCCTCAAGA TGGCTG ATCCAAATCGATTCCGCGGCAAAGATCTTCCGGTCCTGTAGAAGCT-3'	(SEKV. ID NR 59)
10	ikke-kodende (anti-sense) tråd: 5'-AGCTTCTACAGGACCGGAAGATCTTTGCCGCGGAATCGATTGGATCAGCCA TCTTG AGGCTAGCATCTGCGCAGCTCGAGTGTGGCAGTAGCCCTTGCTGCA-3'	(SEKV. ID NR 60)

15 Den syntetiske DNA ble ligert med cDNA-en som koder for aminosyrene 1-880 i human-Rse i PstI-setet som begynner i nukleotid 2 644 i den publiserte human-Rse-cDNA-sekvens (Mark et al., Journal of Biological Chemistry, 269(14):10720-10728 (1994)) og HindIII-seter i polylinkeren i ekspresjonsvektoren

20 pSVI7.ID.LL (se fig. 32 A-L; SEKV. ID NR. 22), hvorved ekspresjonsplasmidet pSV.ID.Rse.gD ble skapt. I korte trekk omfatter ekspresjonsplasmidet et primært dicistrontranskript som inneholder sekvens som koder for DHFR bundet av 5'-spleisedonor- og 3'-spleiseakseptorintronspliceseter, etterfulgt av sekvens

25 som koder for Rse.gD. Fullengdebudskapet (ikke-spleiset) inneholder DHFR som den første åpne leseramme og frembringer derfor DHFR-protein som muliggjør utvelgelse av stabile transformanter.

30 (e) Fremstilling av *mpl*-Rse.gD-nukleinsyre

Ekspresjonsplasmidet pSV.ID.Rse.gD fremstilt som beskrevet ovenfor, ble modifisert til å produsere plasmid pSV.ID.M.tmRd6 som inneholdt de kodende sekvensene for ECD i human-*mpl* (aminosyrene 1-491) fusjonert til transmembran-

35 domenet og det intracellulære domene i Rse.gD (aminosyrene 429-911). Syntetiske oligonukleotider ble brukt til å binde den kodende sekvens i en del av det ekstracellulære domene i human-*mpl* til en del av den Rse-kodende sekvens ved en to-

trinns PCR-kloningsreaksjon som beskrevet av Mark et al., J. Biol. Chem., 267:26166-26171 (1992). Primere brukt til den første PCR-reaksjon, var M1

5 (5'-TCTCGCTACCGTTTACAG-3')
(SEKV. ID NR. 61)

og M2

(5'-CAGGTACCCACCAGGCGGTCTCGGT-3')
(SEKV. ID NR. 62)

10

med et *mpl*-cDNA-templat og R1

(5'-GGGCCATGACACTGTCAA-3')
(SEKV. ID NR. 63)

15 og R2

(5'-GACCGCCACCGAGACCGCCTGGTGGGTACCTGTGGTCCTT-3')
(SEKV. ID NR. 64)

med et *Rse*-cDNA-templat. *Pvu*II-*Sma*I-delen i dette fusjons-
20 knutepunktet ble brukt til konstruksjonen av fullengdekimer-
reseptoren.

(f) Celletransformasjon

DP12.CHO-celler (EP 307 247 publisert 15. mars 1989)
25 ble elektroporert med pSV.ID.M.tmRd6 som var blitt linearisert
i et unikt *Not*I-sete i plasmidryggraden. DNA-en ble etanolut-
felt etter fenol/kloroform-ekstraksjon og ble oppslemmet i
20 µl 1/10 Tris-EDTA. Så ble 10 µg DNA inkubert med 10⁷ CHO-
DP12-celler i 1 ml PBS på is i 10 minutter før elektroporasjon
30 ved 400 V og 330 µf. Cellene ble ført tilbake på is i 10 min-
utter før de ble platet ut i ikke-selektivt medium. Etter
24 timer fikk cellene nukleosidfritt medium for å selekttere
med hensyn på stabile DHFR⁺-kloner.

35 (g) Utvelgelse av transformerte celler for anvendelse i KIRA-ELISA

Kloner som uttrykker *MPL*/*Rse.gD*, ble identifisert ved
hjelp av "western-blotting" av helcellelysater som ble etter-

fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE under anvendelse av anti-stoffet 5B6 som påviser gD-epitopen tag.

(h) Medium

5 Celler ble dyrket i F12/DMEM 50:50 (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). Mediet ble supplert med 10% diafiltrert FBS (HyClone, Logan, Utah), 25 mM HEPES og 2 mM L-glutamin.

(i) KIRA-ELISA

10 *Mpl*-Rse.gD-transformert DP12.CHO-celler ble inokulert (3×10^4 pr. brønn) i brønnene i en flatbunnet 96-brønners kulturplate i 100 μ l medium og dyrket over natten ved 37 °C i 5% CO₂. Den påfølgende morgen ble brønnsupernatantene dekan-
15 tert, og platene ble trykket lett mot et papirhåndkle. 50 μ l medium inneholdende enten forsøksprøver eller 200, 50, 12,5, 3,12, 0,78, 0,19, 0,048 eller 0 ng/ml *mpl*-ligand, ble så tilsatt til hver brønn. Cellene ble stimulert ved 37 °C i 30 minutter, brønnsupernatantene ble dekantert, og platene ble nok
20 en gang lett trykket mot et papirhåndkle. For å lysere cellene og oppløseliggjøre kimærreseptorene ble det tilsatt 100 μ l lysebuffer til hver brønn. Lysebuffer besto av 150 mM NaCl inneholdende 50 mM HEPES (Gibco), 0,5% "Triton-X 100" (Gibco), 0,01% timerosal, 30 KIU/ml aprotinin (ICN Biochemicals,
25 Aurora, OH), 1 mM 4-(2-aminoetyl)benzensulfonylfluoridhydroklorid (AEBSF; ICN Biochemicals), 50 μ M leupeptin (ICN Biochemicals) og 2 mM natriumortovanadat (Na₃VO₄; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), pH 7,5. Platen ble så ristet forsiktig på en platerister (Bellco Instruments, Vineland, NJ) i 60 minutter ved romtemperatur.

30 Mens cellene ble oppløseliggjort, ble en ELISA-mikrotiterplate ("Nunc Maxisorp", Inter Med, Danmark) belagt over natten ved 4 °C med det monoklonale 5B6-anti-gD-antistoff (5,0 μ g/ml i 50 mM karbonatbuffer, pH 9,6, 100 μ l/brønn),
35 presset mot et papirhåndkle og blokkert med 150 μ l/brønn "Block Buffer" (PBS inneholdende 0,5% BSA (Intergen Company, Purchase, NY) og 0,01% timerosal) i 60 minutter ved romtemperatur med forsiktig risting. Etter 60 minutter ble den anti-

gG-5B6-belagte plate vasket 6 ganger med vaskebuffer (PBS inneholdende 0,05% "Tween-20" og 0,01% timerosal) under anvendelse av et automatisert platevaskeapparat ("ScanWasher 300", Skatron Instruments, Inc., Sterling, VA).

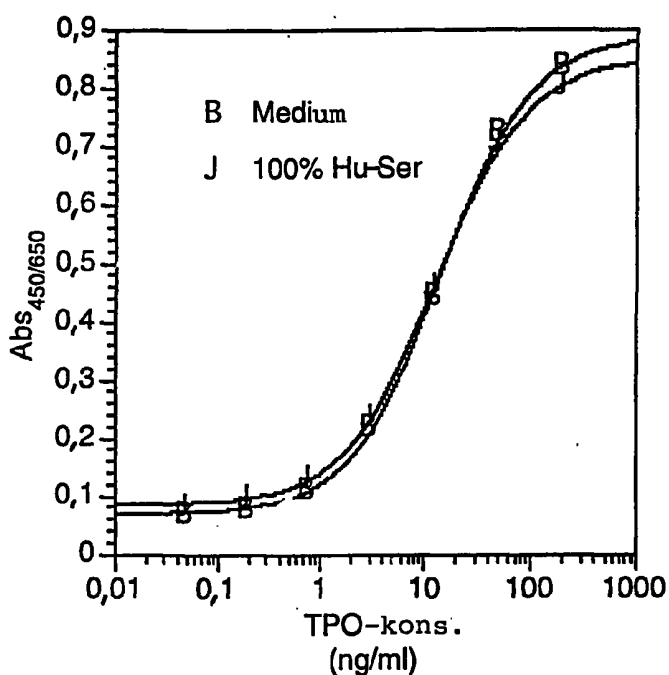
- 5 Lysatet som inneholder oppløseliggjort MPL/Rse.gD fra cellekulturmikrotiterbrønner, ble overført (85 µl/brønn) til anti-gD-5B6-belagt og blokkert ELISA-brønn, og det ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur med forsiktig risting. Den ubundne *mpl*-Rse.gD ble fjernet ved vasking med vaskebuffer og
- 10 100 µl biotinylert 4G10 (anti-fosfotyrosin) fortynnet 1:18 000 i fortynningsbuffer (PBS inneholdende 0,5% BSA, 0,05% "Tween-20", 5 mM EDTA og 0,01% timerosal), dvs. 56 ng/ml, ble tilsatt til hver brønn. Etter inkubasjon i 2 timer ved romtemperatur ble platen vasket, og 100 µl pepperrotperoksidase (HRPO)-konjugert streptavidin (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA)
- 15 fortynnet 1:60 000 i fortynningsbuffer, ble tilsatt til hver brønn. Platen ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur med forsiktig risting. Det frie avidinkonjugat ble vasket bort, og 100 µl nyfremstilt substratoppløsning (tetrametylbenzidin
- 20 (TMB), 2-komponentssubstratsett, Kirkegaard og Perry, Gaithersburg, MD) ble tilsatt til hver brønn. Reaksjonen fikk forløpe i 10 minutter, hvorefter fargefremkallingen ble stanset ved tilsetning av 100 µl/brønn 1,0 M H₃PO₄. Absorbansen ved 450 nm ble avløst med en referansebølgelengde på 650 nm (ABS_{450/650})
- 25 under anvendelse av en vmaks.-plateleser (Molecular Devices, Palo Alto, CA) kontrollert med en Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA) og DeltaSoft programvare (Bio-Metallics, Inc., Princeton, NJ).

- Standardkurven ble frembrakt ved å stimulere
- 30 dp12.trkA,B- eller C.gD-celler med 200, 50, 12,5, 3,12, 0,78, 0,19, 0,048 eller 0 ng/ml *mpl*-ligand og presentert som ng/ml TPO vs. gjennomsnittlig ABS_{450/650} ± sd under anvendelse av DeltaSoft-programmet. Prøvekonsentrasjoner ble fastslått ved interpolasjon av absorbansen på standardkurven og er uttrykt
- 35 som ng/ml TPO-aktivitet.

Mpl-liganden ble funnet å være i stand til å aktivere *mpl*-Rse.gD-kimærreseptoren på en konsentrasjonsavhengig og ligandspesifikk måte. Videre ble *mpl*-Rse.gD-KIRA-ELISA funnet

å være tolerant opp til 100% humanserum (vist) eller 100% plasma (ikke vist), noe som gjorde det mulig å bruke analysen til hurtig screening av pasient- og pK-prøver.

293-produsert TPO₃₃₂ std.kurve



Oppsummering av TPO-EC50-er

TPO-form (celler)	EC50 (vekt/vol)	EC50 (molaritet)
Hu TPO 332 (293)	2,56 ng/ml	67,4 pM
Mu TPO 332 (293)	3,69 ng/ml	97,1 pM
Hu TPO 153 (293)	~41 ng/ml	~1,08 nM
Hu TPO 155 (<i>E. coli</i>)	0,44 ng/ml	11,6 pM
Hu TPO 153met (<i>E. coli</i>)	0,829 ng/ml	21,8 pM

Eksempel 18Reseptorbasert ELISA med hensyn på trombopoietin (TPO)

ELISA-plater ble belagt med kanin-F(ab')₂-anti-humant IgG (Fc) i pH 9,6 karbonatbuffer ved 4 °C over natten. Platene
 5 ble blokkert med 0,5% bovint serumalbumin i PBS ved romtemperatur i 1 time. Fermentorinnhøsting som inneholdt kimærreseptoren, *mpl*-IgG, ble tilsatt til platene, og det ble inkubert i 2 timer. To gangers seriefortynninger (0,39-25 ng/ml) av standarden (TPO₃₃₂ fremstilt i 293-celler med konsentrasjonen bestemt ved hjelp av kvantitativ aminosyreanalyse) og seriefortynnete prøver i 0,5% bovint serumalbumin, 0,05% "Tween 20" ble tilsatt til platene, og det ble inkubert i 2 timer. Bundet TPO ble påvist med protein A-rensede, biotinylerte kaninantistoffer mot TPO₁₅₅ som var blitt produsert i *E. coli* (1 times
 10 inkubasjon), etterfulgt av streptavidinperoksidase (30 minutters inkubasjon) og 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin som substrat. Absorbansen ble avlest ved 450 nm. Platene ble vasket mellom trinnene. For dataanalyse tilpasses standardkurven under anvendelse av et fire-parameters kurvetilpasningsprogram ved
 15 hjelp av "Kaleidagraph". Konsentrasjoner av prøvene ble beregnet ut fra standardkurven.

Eksempel 19Ekspresjon og rensing av TPO fra 293-celler25 1. Fremstilling av 293-celleekspresjonsvektorer

En cDNA som tilsvarer hele den åpne leseramme for TPO, ble erholdt ved hjelp av PCR under anvendelse av de følgende oligonukleotider som primere:

Tabell 11
293-PCR-primere

Cla.FL.F: 5' ATC GAT ATC GAT CAG CCA GAC ACC CCG GCC AG 3'	(SEKV. ID NR 65)
hmpII-R: 5' GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA 3'	(SEKV. ID NR 48)

PRK5-hmpI I (beskrevet i eksempel 9) ble brukt som templat for reaksjonen i nærvær av pfu-DNA-polymerase (Stratagene). Startdenaturering skjedde i 7 minutter ved 94 °C etterfulgt av 25 sykluser med amplifikasjon (1 minutt ved 94 °C, 1 minutt ved 55 °C og 1 minutt ved 72 °C). Sluttforlengelse skjedde i 15 minutter ved 72 °C. PCR-produktet ble rensset og klonet mellom restriksjonssetene ClaI og XbaI i plasmidet pRK5tkneo, en pRK5-avledet vektor modifisert til å uttrykke et neomycinresistensgen under kontroll av tymidinkinasepromoteren, hvorved man fikk vektoren pRK5tkneo.ORF. En andre konstruksjon som tilsvarende det homologe epo-domenet, ble frembrakt på samme måte, men ved å anvende Cla.FL.F som fremoverprimer og den følgende reversprimer:

Arg.STOP.Xba: 5' TCT AGA TCT AGA TCA CCT GAC GCA GAG GGT GGA CC 3'

(SEKV. ID NR. 66)

Sluttkonsentrasjonen kalles pRK5-tkneoEPO-D. Sekvensen til begge konstruksjonene ble verifisert som beskrevet i eksempel 7.

2. Transfeksjon av humanembryonyreceller

Disse to konstruksjonene ble transfektert i humanembryonyreceller ved hjelp av CaPO₄-metoden som beskrevet i eksempel 9. 24 timer etter transfeksjon ble utvelgelse av neomycinresistente kloner startet i nærvær av 0,4 mg/ml G418.10 til 15 dager senere da individuelle kolonier ble overført til 96-brønners plater og fikk vokse til sammenflytning. Ekspressjon av ML₁₅₃ eller ML₃₃₂ i det kondisjonerte medium fra disse

klonene ble fastslått ved å bruke Ba/F3-*mpl*-proliferasjonsanalysen (beskrevet i eksempel 1).

3.Rensing av rhML₃₃₂

5 293-rhML₃₃₂-kondisjonert medium ble påført en "Blue-Sepharose"-kolonne (Pharmacia) som ble ekvilibrert i 10 mM natriumfosfat, pH 7,4 (buffer A). Kolonnen ble deretter vasket med 10 kolonnevolumer hver av buffer A og buffer A inneholdende 2 M urea. Kolonnen ble så eluert med buffer A inneholdende 2 M urea og 1 M NaCl. "Blue-Sepharose"-elueringsblandingen ble så tilført direkte til en "WGA-Sepharose"-kolonne ekvilibrert i buffer A. "WGA-Sepharose"-kolonnen ble så vasket med 10 kolonnevolumer buffer A inneholdende 2 M urea og 1 M NaCl og ble eluert med den samme buffer som inneholdt 0,5 M N-acetyl-D-glukosamin. "WGA-Sepharose"-eluatet ble tilført en C4-HPLC-kolonne (Synchrom, Inc.) ekvilibrert i 0,1% TFA. C4-HPLC-kolonnen ble eluert med diskontinuerlig propanolgradient (0-25%, 25-35%, 35-70%). rhML₃₃₂ ble funnet å eluere i propanolområdet 28-30% i gradienten. Ved hjelp av SDS-PAGE migrerer den rensede rhML₃₃₂ som et bredt bånd i 68-80 kDa-området i gelen (se fig. 15).

4.Rensing av rhML₁₅₃

25 293-rhML₁₅₃-kondisjonert medium ble oppløst på "Blue-Sepharose" som beskrevet for rhML₃₃₂. "Blue-Sepharose"-eluatet ble tilført direkte til en *mpl*-affinitetskolonne som beskrevet ovenfor. RhML₁₅₃ eluert fra *mpl*-affinitetskolonnen, ble rensset inntil homogenitet ved å anvende en C4-HPLC-kolonne kjørt under de samme betingelser som beskrevet for rhML₃₃₂. Ved hjelp av SDS-PAGE oppløses den rensede rhML₁₅₃ i to hoved- og to bi-bånd med Mr på ca. 18 000-21 000 (se fig. 15).

Eksempel 20

Ekspresjon og rensing av TPO fra CHO

35 1.Beskrivelse av CHO-ekspresjonsvektorer

Ekspressjonsvektorene som brukes ved elektroporasjonsfremgangsmåtene beskrevet nedenunder, er blitt betegnet:

pSVI5.ID.LL.MLORF (fullengde eller hTPO₃₃₂) og

pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (avkortet eller hTPO₁₅₃).

De relevante trekkene til disse plasmidene er vist i fig. 23 og 24.

5 2. Fremstilling av CHO-ekspresjonsvektorer

En cDNA som tilsvarer hele den åpne leserammen til hTPO, ble erholdt ved hjelp av PCR under anvendelse av oligonukleotidprimerne ifølge tabell 12.

10 Tabell 12

CHO-ekspresjonsvektor-PCR-primere

15 Cla.FL.F2 5' ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G 3'	(SEKV. ID NR 47)
ORF. Sal 5' AGT CGA CGT CGA CGT CGG CAG TGT CTG AGA ACC 3'	(SEKV. ID NR 67)

PRK5-hmp1 I (beskrevet i eksempel 7 og 9) ble brukt som templat for reaksjonen i nærvær av pfu-DNA-polymerase (Stratagene). Startdenaturering skjedde i 7 minutter ved 94 °C etterfulgt av 25 sykluser med amplifikasjon (1 minutt ved 94 °C, 1 minutt ved 55 °C og 1 minutt ved 72 °C). Sluttforlen- gelse skjedde i 15 minutter ved 72 °C. PCR-produktet ble ren- set og klonet mellom restriksjonssetene ClaI og SalI i plasmidet pSVI5.ID.LL, hvorved man fikk vektoren pSVI5.ID.LL.MLORF. En andre konstruksjon tilsvarende det homologe EPO-domene, ble frembrakt på samme måte, men ved å anvende Cla.FL.F2 som fremoverprimer og den følgende revers- primer:

EPOD.Sal 5' AGT CGA CGT CGA CTC ACC TGA CGC AGA GGG TGG ACC 3'
(SEKV. ID NR. 68)

35 Sluttkonstruksjonen er kalt pSVI5.ID.LL.MLEPO-D. Sekvensen til begge konstruksjonene ble verifisert som beskrevet i eksempel 7 og 9.

I korte trekk ble de kodende sekvensene for fullengde

og avkortet ligand innført i multippelkloningssettet til CHO-ekspressjonsvektoren pSVI5.ID.LL. Denne vektoren inneholder SV40 tidlig promoter/enhancer-området, en modifisert spleise-enhet som inneholder muse-DHFR-cDNA, et multippelkloningssete
 5 for innføring av det aktuelle gen (i dette tilfellet TPO-sekvensene som er beskrevet), et SV40-polyadenyleringssignal og replikasjonsopprinnelsessted, og beta-laktamasegenet for plasmidutvelgelse og amplifikasjon i bakterier.

10 3. Metodikk for etablering av stabile CHO-cellelinjer som uttrykker rekombinant human-TPO₃₃₂ og -TPO₁₅₃

a. Beskrivelse av CHO-opphavscellelinje

Verts-CHO-cellelinjen (ovariecellelinje fra kinesisk hamster) som ble anvendt til ekspressjonen av TPO-molekylerne
 15 beskrevet her, er kjent som CHO-DP12 (se EP 307 247 publisert 15. mars 1989). Denne pattedyrcellelinje ble utvalgt klonalt fra en transfeksjon av opphavslinjen (CHO-K1 DUX-B11(DHFR-), erholdt fra dr. Frank Lee, Stanford University, med tillatelse av dr. L. Chasin) med en vektor som uttrykker preproinsulin,
 20 hvorved man får kloner med reduserte insulinkrav. Disse cellene er også DHFR-minus, og kloner kan velges ut med hensyn på tilstedeværelsen av DHFR-cDNA-vektorsekvenser ved dyrking på medium som er uten nukleosidsupplementer (glysin, hypoksantin og tymidin). Dette utvelgelsessystem for stabilt uttrykkende
 25 CHO-cellelinjer er vanlig anvendt.

b. Transfeksjonsfremgangsmåte (elektroporasjon)

Det ble frembrakt TPO₃₃₂- og TPO₁₅₃-uttrykkende celler ved å transfektere DP12-celler via elektroporasjon (se
 30 f.eks. Andreason, G.L., J. Tiss. Cult. Meth., 15, 56 (1993)) med henholdsvis lineariserte pSVI5.ID.LL.MLORF- eller pSVI5.ID.LL.MLEPO-D-plasmider. Det ble oppstilt tre (3) restriksjonsenzymreaksjonsblandinger for hver plasmidkutting; 10 µg, 25 µg og 50 µg av vektoren med enzymet NOTI ved hjelp
 35 av standard molekylærbiologiske metoder. Dette restriksjonssete finnes bare én gang i vektoren i det lineariserte område 3' og utenfor TPO-ligandtranskripsjonsenhetene (se fig. 23). De 100 µl store reaksjonsblandingene ble oppstilt for inkuba-

sjon over natten ved 37 °C. Den neste dag ble blandingen ekstrahert med fenol, kloroform og isoamylalkohol i forholdet 50:49:1 én gang og etanolutfelt på tørris i omtrent 1 time. Utfellingen ble så samlet opp ved hjelp av en 15-minutters mikrosentrifugering og tørket. Den lineariserte DNA ble på nytt oppslemmet i 50 µl Hams DMEM-F12 1:1-medium supplert med standardantibiotika og 2 mM glutamin.

Suspensjonsvoksende DP12-celler ble samlet opp, vasket én gang i mediet beskrevet for ny oppslemming av DNA-en og til sist oppslemmet i det samme medium ved en konsentrasjon på 10^7 celler pr. 750 µl. Aliquoter av celler (750 µl) og hver lineariserte DNA-blanding ble inkubert sammen ved romtemperatur i 1 time og så overført til et BRL-elektroporasjonskammer. Hver reaksjonsblanding ble så elektroporert i et standard BRL elektroporasjonsapparat ved 350 V innstilt ved 330 µF og lav kapasitans. Etter elektroporasjon fikk cellene være i apparatet i 5 minutter og så på is i en ytterligere 10 minutters inkubasjonsperiode. De elektroporerte celler ble overført til 60 mm cellekulturskåler inneholdende 5 ml standard, komplett dyrkningsmedium for CHO-celler (høyglukose-DMEM-F12 50:50 uten glysin, supplert med 1X GHT, 2 mM glutamin og 5% føtalt kalveserum) og dyrket over natten i en 5% CO₂-cellekulturinkubator.

25 c. Utvelgelses- og screeningsmetode

Neste dag ble celler trypsinisert fra platene ved hjelp av standardmetoder og overført til 150 mm vevskulturskåler inneholdende DHFR-selektivt medium (Hams DMEM-F12, 1:1 medium beskrevet ovenfor supplert med enten 2% eller 5% dialysert, føtalt kalveserum, men uten glysin, hypoksantin og tymidin, som er det anvendte standard DHFR-seleksjonsmedium). Celler fra hver 60 mm-skål ble deretter utplatet på nytt i 5/150 mm skåler. Cellene ble så inkubert i 10 til 15 dager (med ett mediumskifte) ved 37 °C/5% CO₂ inntil kloner begynte å komme til syne og nådde størrelser som kan underkastes overføring til 96-brønners skåler. I løpet av et tidsrom på 4-5 dager ble cellelinjene overført til 96-brønners skåler under anvendelse av sterile, gule spisser på et "pipettman"-sett ved

50 ml. Cellene fikk vokse til sammenflytning (vanligvis 3-5 dager), og så ble brettene trypsinisert, og to kopier av det opprinnelige brett ble reprodusert. To av disse kopiene ble lagret kortvarig i fryseren med celler i hver brønn fortynnet i 50 µl 10% FCS i DMSO. 5 dagers prøver i kondisjonert, serumfritt medium ble analysert fra sammenflytende brønner i det tredje brettet med hensyn på TPO-ekspresjon via den Ba/F-cellebaserte aktivitetsanalyse. De sterkest uttrykkende kloner basert på denne analysen, ble gjenopplivet fra lagring og oppskalert til to sammenflytende 150 mm T-kolber for overføring til cellekulturgruppen for suspensjonstilpasning, ny analyse og lagring.

d. Amplifikasjonsfremgangsmåte

Flere av cellelinjene med høy titer fra utvalget beskrevet ovenfor, ble deretter sendt gjennom et standard metotrexatamplifikasjonsregime for å frembringe kloner med høyere titer. CHO-cellekloner formeres og plates ut i 10 cm skåler ved 4 konsentrasjoner av metotrexat (dvs. 50 nM, 100 nM, 200 nM og 400 nM) ved to eller tre celleantall (10⁵, 5 x 10⁵ og 10⁶ celler pr. skål). Disse kulturene inkuberes så ved 37 °C/5% CO₂ inntil kloner er etablert og kan underkastes overføring til 96-brønners skåler for videre analyse. Flere kloner med høy titer fra dette utvalget ble igjen underkastet høyere konsentrasjoner av metotrexat (dvs. 600 nM, 800 nM, 1 000 nM og 1 200 nM), og som tidligere får resistente kloner etableres og overføres så til 96-brønners skåler og analysere.

4. Dyrkning av stabile CHO-cellelinjer som uttrykker

rekombinant human-TPO₃₃₂ og -TPO₁₅₃

Lagrede celler tines opp, og cellepopulasjonen formeres ved hjelp av standard celledyrkningsmetoder i enten serumfritt eller serumholdig medium. Etter formering til tilstrekkelig celletetthet vaskes cellene for å fjerne brukt celledyrkningsmedium. Cellene dyrkes så ved hjelp av hvilken som helst standardmetode, inkludert: satsvis, satsvis med tilførsel av næring eller kontinuerlig dyrkning ved 25-40 °C, nøytral pH, med et innhold av oppløst O₂ på minst 5% inntil det

konstitutivt utskilte TPO er akkumulert. Cellekulturvæske fra-
skilles så fra cellene ved hjelp av mekaniske midler, slik som
sentrifugering.

5 5. Rensing av rekombinant human-TPO fra CHO-kulturvæsker

Innhøstet cellekulturvæske (HCCF) føres direkte til
en "Blue Sepharose 6 Fast Flow"-kolonne (Pharmacia) ekvili-
brert i 0,01 M Na-fosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl ved et forhold
på omtrent 100 l HCCF pr. liter harpiks, og en lineær strø-
10 ningshastighet på omtrent 300 ml/time/cm². Kolonnen vaskes så
med 3-5 kolonnevolumer med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av
3-5 kolonnevolumer 0,01 M Na-fosfat, pH 7,4, 2,0 M urea. TPO
elueres så med 3-5 kolonnevolumer 0,01 M Na-fosfat, pH 7,4,
2,0 M urea, 1,0 M NaCl.

15 "Blue Sepharose"-blandingen som inneholder TPO, føres
så til en "Wheat Germ Lectin Sepharose 6MB"-kolonne (Pharma-
cia) ekvilibrert i 0,01 M Na-fosfat, pH 7,4, 2,0 M urea og
1,0 M NaCl ved et forhold fra 8 til 16 ml "Blue Sepharose"-
blanding pr. ml harpiks ved en strømningshastighet på omtrent
20 50 ml/time/cm². Kolonnen vaskes så med 2 til 3 kolonnevolumer
ekvilibreringsbuffer. TPO elueres så med 2-5 kolonnevolumer
0,01 M Na-fosfat, pH 7,4, 2,0 M urea, 0,5 M N-acetyl-D-glukos-
amin.

"Wheat Germ Lectin"-blandingen reguleres så til en
25 sluttkonsentrasjon på 0,04% C₁₂E₈ og 0,1% trifluoreddiksyre
(TFA). Den resulterende blanding føres til en C4-reversfase-
kolonne ("Vydac 214TP1022") ekvilibrert i 0,1% TFA, 0,04% C₁₂E₈
ved en påfylling på omtrent 0,2 til 0,5 mg protein pr. ml har-
piks ved en strømningshastighet på 157 ml/time/cm².

30 Proteinet elueres i en tofasers lineærgradient av
acetonitril inneholdende 0,1% TFA, 0,04% C₁₂E₈. Den første
fasen er sammensatt av en lineær gradient fra 0 til 30% aceto-
nitril i 15 minutter. Den andre fasen er sammensatt av en
lineær gradient fra 30 til 60% acetonitril i 60 minutter. TPO
35 eluerer ved omtrent 50% acetonitril. En blanding lages på
grunnlag av SDS-PAGE.

C4-blandingen fortynnes så med 2 volumdelar 0,01 M
Na-fosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl og diafiltreres mot omtrent

6 volumdelar 0,001 M Na-fosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl på en "Amicon YM" eller lignende ultrafiltreringsmembran med en molekylvektsgrense på 10 000 til 30 000 dalton. Det resulterende diafiltrat kan så bearbeides direkte eller konsentreres
 5 videre ved hjelp av ultrafiltrering. Diafiltratet/konsentratet reguleres til en sluttkonsentrasjon på 0,01% "Tween-80".

Alt eller en del av diafiltratet/konsentratet som er ekvivalent med 2-5% av det beregnede kolonnevolum, føres så til en "Sephacryl S-300 HR"-kolonne (Pharmacia) ekvilibrent i
 10 0,01 M Na-fosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,01% "Tween-80", og kromatograferes ved en strømningshastighet på omtrent 17 ml/time/cm². De TPO-holdige fraksjoner som er frie for aggregat og proteolytiske nedbrytningsprodukter, slås sammen på grunnlag av SDS-PAGE. Den resulterende blanding filtreres på
 15 et 0,22 µm filter, "Millex-GV" eller lignende, og lagres ved 2-8 °C.

Eksempel 21

Transformasjon og induksjon av TPO-proteinsyntese i *E. coli*

20 1. Konstruksjon av *E. coli* TPO-ekspresjonsvektorer

Plasmidene pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 og pMP202 er alle utformet for å uttrykke de første 155 aminosyrene i TPO nedstrøms fra en liten leder som varierer mellom de forskjellige konstruksjonene. Lederne sørger primært for høynivåtrans-
 25 lasjonsinitiering og hurtig rensing. Plasmidene pMP210-1, -T8, -21, -22, -24 og -25 er utformet for å uttrykke de første 153 aminosyrene i TPO nedstrøms for et initieringsmetionin og atskiller seg bare ved kodonbruken for de første 6 aminosyrene i TPO, mens plasmidet pMP251 er et derivat av pMP210-1 hvor
 30 den karboksyterminale ende i TPO er forlenget ved hjelp av to aminosyrer. Alle de ovenfor nevnte plasmider vil gi høye nivåer av intracellulær ekspresjon av TPO i *E. coli* etter induksjon av tryptofanpromoter (Yansura, D.G. et al., Methods in Enzymology (Goeddel, D.V., red.), 185:54-60, Academic
 35 Press, San Diego (1990)). Plasmidene pMP1 og pMP172 er mellomprodukter ved konstruksjonen av de ovenfor nevnte, intracellulære TPO-ekspresjonsplasmider.

(a) Plasmid pMP1

Plasmidet pMP1 er en sekresjonsvektor for de første 155 aminosyrene i TPO, og ble konstruert ved å ligere sammen 5 fragmenter av DNA som viste fig. 33. Det første av disse var vektoren pPho21 hvor det lille MluI-BamHI-fragment var blitt fjernet. pPho21 er et derivat av phGH1 (Chang, C.N. et al., Gene 55:189-196 (1987)) hvor det humane veksthormongen er blitt erstattet med *E. coli*-phoA-gen, og MluI-restriksjonssetet er blitt kunstig fremstilt i den kodende sekvens for StII-signalsekvensen i aminosyrene 20-21.

De neste to fragmentene, et 258 basepar stort HinfI-PstI-stykke av DNA fra pRK5-hmpl I (eksempel 9) som koder for TPO-aminosyrene 19-103, og den følgende, syntetiske DNA som koder for aminosyrene 1-18

5'-CGCGTATGCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGACCTCCGAGTCCTCAGTAACTGCTTCG
TG

ATACGGTCTGGGCCGAGGAGGACGAACACTGGAGGCTCAGGAGTCATTTGACGAAGC
ACTGA-5'

(SEKV. ID NR. 69)

(SEKV. ID NR. 70)

ble preligert med T4-DNA-ligase og deretter kuttet med PstI. Det fjerde var et 152 basepar stort PstI-HaeIII-fragment fra pRK5hmplI som koder for aminosyrene 104-155 i TPO. Det siste var et 412 basepar stort StuI-BamHI-fragment fra pdh108 som inneholder lambda til transkripsjonsterminator, som tidligere beskrevet (Scholtissek, S. et al., NAR, 15:3185 (1987)).

(b) Plasmid pMP21

Plasmidet pMP21 er utformet for å uttrykke de første 155 aminosyrene i TPO ved hjelp av en 13 aminosyrers leder som omfatter en del av STII-signalsekvensen. Det ble konstruert ved å ligere sammen tre (3) DNA-fragmenter som vist i fig. 34, hvorav det første av disse var vektoren pVEG31 hvor det lille XbaI-SphI-fragment var blitt fjernet. Vektoren pVEG31 er et derivat av pGH207-1 (de Boer, H.A. et al., i Promoter Structure and Function (Rodriguez, R.L. og Chamberlain, M.J.,

red.), 462, Praeger, New York (1982)) hvor humanveksthormon-genet er blitt erstattet med genet for vaskulær endotelvekst-faktor (dette identiske vektorfragment kan erholdes fra dette sistnevnte plasmid).

5 Den andre delen i ligeringen var en syntetisk DNA-dupleks med den følgende sekvens:

10 5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCCTTCTTAA

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTGCGC-5'

(SEKV. ID NR. 71)

15 (SEKV. ID NR. 72)

Det siste stykket var et 1072 basepar stort MluI-SphI-fragment fra pMP1 som koder for 155 aminosyrer av TPO.

20 (c) Plasmid pMP151

Plasmidet pMP151 er utformet til å uttrykke de første 155 aminosyrene av TPO nedstrøms for en leder som omfatter 7 aminosyrer av STII-signalsekvensen, 8 histidiner og et fak-
25 tor Xa-spaltingssete. Som vist i fig. 35, ble pMP151 konstru-ert ved å ligere sammen tre DNA-fragmenter, hvorav det første av disse var den tidligere beskrevne vektor pVEG31 hvorfra det lille XbaI-SphI-fragment var blitt fjernet. Det andre var en syntetisk DNA-dupleks med den følgende sekvens:

30 5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCATCACCATCACCATCACCATCACATCGAAG
GTCGTAGCC

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGCTTC
CAGCAT-5'

35 (SEKV. ID NR. 73)

(SEKV. ID NR. 74)

Det siste var et 1 064 basepar stort BglI-SphI-fragment fra pMP11 som koder for 154 aminosyrer i TPO. Plasmidet pMP11 er identisk med unntak av noen få kodonendringer i STII-signal-sekvensen (dette fragment kan fås fra pMP1).

5

(d) Plasmid pMP202

Plasmidet pMP202 er svært likt ekspresjonsvektoren pMP151 med unntak av at faktor Xa-spaltungssetet i lederen er blitt erstattet med et trombinspaltingssete. Som vist i fig. 36, ble pMP202 konstruert ved å ligere sammen tre DNA-fragmenter. Det første av disse var det tidligere beskrevne pVEG31 hvor det lille XbaI-SphI-fragment var blitt fjernet. Det andre var en syntetisk DNA-dupleks med den følgende sekvens:

10

15

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTTCATCACCATCACCATCACCATCACATCGAA
CCACGTAGCC
TTAATACTTTTCTTATAGCGTAAAGTAGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGTAGCTT
GGTGCAT-5'

20

(SEKV. ID NR. 75)

(SEKV. ID NR. 76)

Det siste stykket var et 1 064 basepar stort BglI-SphI-fragment fra det tidligere beskrevne plasmid pMP11.

25

(e) Plasmid pMP172

Plasmidet pMP172 er en sekresjonsvektor for de første 153 aminosyrene i TPO og er et mellomprodukt for konstruksjon av pMP210. Som vist i fig. 37, ble pMP172 fremstilt ved å ligere sammen tre DNA-fragmenter, hvorav det første var vektoren pLS321amB hvor det lille EcoRI-HindIII-avsnittet var blitt fjernet. Det andre var et 946 basepar stort EcoRI-HgaI-fragment fra det tidligere beskrevne plasmid pMP11. Det siste stykket var en syntetisk DNA-dupleks med den følgende sekvens:

35

5'-TCCACCCTCTGCGTCAGGT

(SEKV. ID NR. 77)

GGAGACGCAGTCCATCGA-5'

(SEKV. ID NR. 78)

(f) Plasmid pMP210

Plasmidet pMP210 er utformet for å uttrykke de første 153 aminosyrene i TPO etter et translasjonsinitieringsmetionin. Dette plasmidet ble faktisk laget som en bank med plasmider hvor de første 6 kodonene i TPO ble vilkårlig fordelt i den tredje stilling i hvert kodon, og ble konstruert som vist i fig. 38 ved ligeringen av tre DNA-fragmenter. Det første av disse var den tidligere beskrevne vektor pVEG31 hvor det lille XbaI-SphI-fragment var blitt fjernet. Det andre var en syntetisk DNA-dupleks som er vist nedenunder, behandlet først med DNA-polymerase I (Klenow), etterfulgt av fordøyelse med XbaI og HinfI, og som koder for initieringsmetioninet og de randomiserte første 6 kodonene i TPO.

5'-GCAGCAGTTCTAGAATTATGTCNCCNGCNCNCNCNCNTGTGACCTCCGA

ACACTGGAGGCT

GTTCTCAGTAAA ((SEKV. ID NR. 79)

CAAGAGTCATTTGACGAAGCACTGAGGGTACAGGAAG-5' (SEKV. ID NR. 80)

Det tredje var et 890 basepar stort HinfI-SphI-fragment fra pMP172 som koder for aminosyrene 19-153 i TPO.

Plasmid-pMP210-banken med omtrent 3 700 kloner ble retransformert på LB-plater med høyt innhold av tetrasyklin (50 µg/ml) for å velge ut høytranslasjonelle initieringskloner (Yansura, D.G. et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 4:151-158 (1992)). Av de åtte koloniene som kom opp på høytetrasyklinplater, ble fem av de beste når det gjelder TPO-ekspresjon, underkastet DNA-sekvensering, og resultatene er vist i fig. 39 (SEKV. ID NR. 23, 24, 25, 26, 27 og 28).

(g) Plasmid pMP41

Plasmidet pMP41 er utformet for å uttrykke de første 155 aminosyrene i TPO fusjonert til en leder som består av 7 aminosyrer av STII-signalsekvensen, etterfulgt av et faktor Xa-spaltingssete. Plasmidet ble konstruert som vist i fig. 40 ved å ligere sammen tre stykker av DNA, hvorav det første var den tidligere beskrevne vektor pVEG31 hvor det lille XbaI-SphI-fragment var blitt fjernet. Det andre var den følgende

syntetiske DNA-dupleks:

5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTATCGAAGGTCGTAGCC (SEKV. ID NR. 81)

5 TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAATAGCTTCCAGCAT-5' (SEKV. ID NR. 82)

10 Det siste stykket av ligeringen var det 1 064 basepar store
BglI-SphI-fragment fra det tidligere beskrevne plasmid pMP11.

(h) Plasmid pMP57

Plasmidet pMP57 uttrykker de første 155 aminosyrene i
TPO nedstrøms for en leder som består av 9 aminosyrer av STII-
15 signalsekvensen og tobasesetet Lys-Arg. Dette tobasesete
sørger for et middel for å fjerne lederen med proteasen ArgC.
Dette plasmid ble konstruert som vist i figur 41 ved å ligere
sammen tre DNA-stykker. Det første av disse var den tidligere
beskrevne vektor pVEG31 hvor det lille XbaI-SphI-fragment var
20 blitt fjernet. Det andre var den følgende syntetiske DNA-
dupleks:

25 5'-CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTCTTCTTAAACGTAGCC (SEKV. ID NR. 83)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAATTTGCAT-5' (SEKV. ID NR. 84)

30 Den siste delen av ligeringen var det 1 064 basepar store
BglI-SphI-fragment fra det tidligere beskrevne plasmid pMP11.

(i) Plasmid pMP251

Plasmidet pMP251 er et derivat av pMP210-1 hvor to
35 ytterligere aminosyrer fra TPO er inkludert i den karboksyter-
minale ende. Som vist i figur 42, ble dette plasmid konstruert
ved å ligere sammen to stykker av DNA, idet det første av
disse var det tidligere beskrevne pMP21 hvor det lille XbaI-

ApaI-fragment var blitt fjernet. Den andre delen av ligeringen var et 316 basepar stort XbaI-ApaI-fragment fra pMP210-1.

2. Transformasjon og induksjon av *E. coli* med TPO-eks-presjonsvektorer

De ovenfor nevnte TPO-ekspresjonsplasmider ble brukt til å transformere *E. coli*-stamme 44C6 (w3110 tonA_Δ rpoH_{ts} lon_Δ clpP_Δ galE) under anvendelse av CaCl₂-varmesjokkmetoden (Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53:159-162, (1970)). De transformerte celler ble dyrket først ved 37 °C i LB-medium inneholdende 50 µg/ml karbenicillin inntil optisk tetthet (600 nm) av kulturen nådde omtrent 2-3. LB-kulturen ble så fortynnet 20 ganger i M9-medium inneholdende 0,49% kasamino-syrer (vekt/volum) og 50 µg/ml karbenicillin. Etter dyrkning ved lufting ved 30 °C i 1 time ble indol-3-akrylsyre tilsatt inntil en sluttkonsentrasjon på 50 µg/ml. Kulturen fikk så fortsette å vokse ved 30 °C med lufting i ytterligere 15 timer, hvorefter cellene ble innhøstet ved sentrifugering.

Eksempel 22

Fremstilling av biologisk aktivt TPO (Met⁻¹ 1-153) i *E. coli*

Fremgangsmåtene angitt nedenunder for fremstilling av biologisk aktivt, gjenfoldet TPO (met⁻¹ 1-153) kan anvendes analogt med utvinningen av de øvrige TPO-varianter inkludert N- og C-terminale, forlengede former (se eksempel 23).

A. Utvinning av ikke-oppløselig TPO (Met⁻¹ 1-153)

E. coli-celler som uttrykker TPO (Met⁻¹ 1-153) som kodes for av plasmidet pMP210-1, fermenteres som beskrevet ovenfor. Vanligvis oppslemmes ca. 100 g celler på nytt i 1 l (10 volumdeler) celleoppbrytningsbuffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) med en "Polytron"-homogenisator, og cellene sentrifugeres ved 5 000 x g i 30 minutter. Den vaskede cellepellet oppslemmes igjen på nytt i 1 l celleoppbrytningsbuffer med "Polytron"-homogenisatoren, og celleduspensjonen sendes gjennom en "LH Cell Disrupter" (LH Inceltech, Inc.), eller gjennom en "Microfluidizer" (Microfluidics International) i henhold

til produsentens instruksjoner. Suspensjonen sentrifugeres ved 5 000 g i 30 minutter, og det oppslemmes på nytt og sentrifugeres en andre gang for å lage en vasket "refractile body pellet". Den vaskede pellet brukes umiddelbart eller lagres nedfrys-
 5 fryst ved et -70 °C.

B. Oppløseliggjøring og rensing av monomer-TPO (Met⁻¹ 1-153)

Pelleten omtalt ovenfor, oppslemmes på nytt i 5 vektvolumdeler 20 mM Tris, pH 8, med 6-8 M guanidin og 25 mM DTT
 10 (ditiotreitol) og omrøres i 1-3 timer, eller over natten, ved 4 °C for å bevirke oppløseliggjøring av TPO-proteinet. Høye konsentrasjoner av urea (6-8 M) kan også anvendes, men resulterer generelt i lavere utbytter sammenlignet med guanidin. Etter oppløseliggjøring sentrifugeres oppløsningen ved 30 000
 15 x g i 30 minutter, hvorved man får en klar supernatant som inneholder denaturert, monomert TPO-protein. Supernatanten kromatograferes så på en "Superdex 200"-gelfiltreringskolonne (Pharmacia, 2,6 x 60 cm) ved en strømningshastighet på 2 ml/min., og proteinet elueres med 20 mM Na-fosfat, pH 6,0, idet
 20 10 mM DTT-fraksjoner inneholdende monomert, denaturert TPO-protein som eluerer mellom 160 og 200 ml, slås sammen. TPO-proteinet renses ytterligere på en halvpreparativ C4-reversfasekolonne (2 x 20 cm "Vydac"). Prøven tilføres ved 5 ml/min. til en kolonne ekvilibrert i 0,1% TFA (trifluoreddiksyre) med
 25 30% acetonitril. Proteinet elueres med en lineær gradient acetonitril (30-60% i 60 min.). Det rensede, reduserte protein eluerer ved omtrent 50% acetonitril. Dette materiale brukes til gjenfolding, hvorved det fås biologisk aktiv TPO-variant.

30 C. Frembringelse av biologisk aktiv TPO (Met⁻¹ 1-153)

Omtrent 20 mg monomer, redusert og denaturert TPO-protein i 40 ml 0,1% TFA/50% acetonitril fortynnes i 360 ml gjenfoldingsbuffer som inneholder optimal de følgende reagen-
 35 senger:

50 mM Tris
 0,3 M NaCl
 5 mM EDTA

2% CHAPS-detergent
 25% glyserol
 5 mM oksidert glutation
 1 mM redusert glutation
 pH justert til 8,3

Etter blanding omrøres gjenfoldingsbufferen forsiktig ved 4 °C i 12-48 timer for å bevirker maksimale gjenfoldings-
 10 utbytter av den korrekte, disulfidbundne form av TPO (se nedenunder). Oppløsningen surgjøres så med TFA inntil en sluttkonsentrasjon på 0,2%, filtreres gjennom et 0,45 eller 0,22 µm filter, og 1/10 volum acetonitril tilsettes. Denne oppløsningen pumpes så direkte på en C4-reversfasekolonne og
 15 renset, gjenfoldet TPO (Met⁻¹ 1-153) elueres med det samme gradientprogram som ovenfor. Gjenfoldet, biologisk aktiv TPO elueres ved omtrent 45% acetonitril under disse betingelsene. Ukorrekte, disulfidbundne versjoner av TPO elueres tidligere. Det endelige, rensede TPO (Met⁻¹ 1-153) er mer enn 95% rent,
 20 som fastslått ved hjelp av SDS-geler og analytisk C4-reversfasekromatografi. For dyrestudier ble det C4-rensede materiale dialysert i fysiologisk forenlige buffere. Isotone buffere (10 mM Na-acetat, pH 5,5, 10 mM Na-succinat, pH 5,5 eller 10 mM Na-fosfat, pH 7,4) inneholdende 150 mM NaCl og 0,01%
 25 "Tween 80", ble benyttet.

På grunn av den høye styrken til TPO i Ba/F3-analysen (halvmaksimal stimulering oppnås ved omtrent 3 pg/ml) er det mulig å oppnå biologisk aktivt materiale ved å benytte mange forskjellige buffer-, detergent- og redox-betingelser. Under
 30 de fleste betingelser oppnås imidlertid bare en liten mengde korrekt foldet materiale (<10%). For kommersielle fremstillingsprosesser er det ønskelig å få gjenfoldingsutbytter på minst 10%, mer foretrukket 30-50%, og mest foretrukket >50%. Mange forskjellige detergenter ("Triton X-100", dodecyl-beta-
 35 maltosid, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkosyl, "Tween 20" og "Tween 80", "Zwittergent 3-14" og andre) ble fastslått med hensyn på virkningsfullhet når det gjelder å understøtte høye gjenfoldingsutbytter. Av disse detergentene ble bare CHAPS-familien

(CHAPS og CHAPSO) funnet å være generelt anvendbar ved gjenfoldingsreaksjonen for å begrense proteinaggregasjon og ukorrekt disulfiddannelse. Nivåer av CHAPS som er høyere enn 1%, var mest anvendbare. Natriumklorid var påkrevet for best mulige utbytter, idet de optimale nivåene var mellom 0,1 M og 0,5 M. Tilstedeværelsen av EDTA (1-5 mM) begrenset mengden av metallkatalysert oksidasjon (og aggregasjon) som ble observert med noen preparater. Glyserolkonsentrasjoner som er høyere enn 15%, ga de optimale gjenfoldingsbetingelser. For maksimale utbytter var det av avgjørende betydning å ha både oksidert og redusert glutathion eller oksidert og redusert cystein som redox-reagenspar. Generelt høyere utbytter ble observert når molforholdet oksidert reagens er likt eller over det reduserte reagensmedlem i redox-paret. pH-verdier mellom 7,5 og ca. 9 var optimale for gjenfolding av disse TPO-variantene. Organiske oppløsningsmidler (f.eks. etanol, acetonitril, metanol) ble tolerert ved konsentrasjoner på 10-15% eller lavere. Høyere nivåer av organiske oppløsningsmidler økte mengden av ukorrekt foldede former. Tris- og fosfatbufferer var generelt anvendbare. Inkubasjon ved 4 °C ga også høyere nivåer av korrekt foldet TPO.

Gjenfoldingsutbytter på 40-60% (basert på mengden av redusert og denaturert TPO brukt ved gjenfoldingsreaksjonen) er typiske for preparater av TPO som er blitt rensset gjennom det første C4-trinnet. Aktivt materiale kan oppnås når mindre rene preparater (f.eks. direkte etter "Superdex 200"-kolonnen eller etter den innledende "refractile body"-ekstraksjon) anvendes selv om utbyttene er mindre på grunn av omfattende utfelling og interferens av ikke-TPO-proteiner under TPO-gjenfoldingsprosessen.

Ettersom TPO (Met⁻¹ 1-153) inneholder 4 cysteinrester, er det mulig å frembringe tre forskjellige disulfidversjoner av dette proteinet:

versjon 1: disulfider mellom cysteinrestene 1-4 og 2-3

versjon 2: disulfider mellom cysteinrestene 1-2 og 3-4

versjon 3: disulfider mellom cysteinrestene 1-3 og

2-4.

Under den innledende undersøkelse ved bestemmelse av gjenfoldingsbetingelser ble flere forskjellige topper inneholdende TPO-proteinet, separert ved hjelp av C4-reversfasekromatografi. Bare én av disse toppene hadde signifikant biologisk aktivitet som bestemt under anvendelse av Ba/F3-analysen. Deretter ble gjenfoldingsbetingelsene optimalisert slik at man fortrinnsvis fikk den versjonen. Under disse betingelsene er de feilfoldede versjoner mindre enn 10-20% av det totale monomer-TPO som ble oppnådd.

Disulfidmønsteret for det biologisk aktive TPO er blitt bestemt til å være 1-4 og 2-3 ved hjelp av massespektrometri og proteinsekvensering (dvs. versjon 1). Aliquoter av de forskjellige C4-oppløste topper (5-10 nmol) ble fordøyd med trypsin (1:25 molforhold mellom trypsin og protein). Fordøyelsesblandingen ble analysert ved matriksassistert laserdesorpsjonsmassespektrometri før og etter reduksjon med DTT. Etter reduksjon ble det påvist masser som tilsvarer mesteparten av de store tryptiske peptidene i TPO. I de ureduserte prøver manglet noen av disse massene, og nye masser ble observert. Massen til de nye toppene tilsvarte grunnleggende summen av de individuelle tryptiske peptidene involvert i disulfidparet. Det var således mulig utvetydig å fastlegge disulfidmønsteret til det gjenfoldede, rekombinante, biologisk aktive TPO til å være 1-4 og 2-3. Dette er i overensstemmelse med det kjente disulfidmønster til det beslektede molekyll erythropoietin.

D.Biologisk aktivitet av rekombinant, gjenfoldet TPO (met 1-153)

Gjenfoldet og rensset TPO (Met⁻¹ 1-153) har aktivitet ved analyser både *in vitro* og *in vivo*. Ved Ba/F3-analysen ble det oppnådd halvmaksimal stimulering av tymidininkorporering i Ba/F3-cellene ved 3,3 pg/ml (0,3 pM). Ved den *mpl*-reseptor-baserte ELISA inntrådte halvmaksimal aktivitet ved 1,9 ng/ml (120 pM). I normale og myeloundertrykte dyr fremstilt ved hjelp av nær dødelig røntgenstråling, var TPO (Met⁻¹ 1-153) svært sterk (aktivitet ble sett ved doser så lave som 30 ng/mus) når det gjelder å stimulere fremstillingen av nye blod-

plater.

Eksempel 23

5 Fremstilling av andre biologisk aktive TPO-varianter i *E. coli*

Tre forskjellige TPO-varianter fremstilt i *E. coli*, renset og gjenfoldet i biologisk aktive former, er tilveiebrakt nedenunder.

10 (1) MLF - 13-rester fra den bakterieavledede signal-sekvens STII fusjoneres til det N-terminale domene i TPO (restene 1-155). Den resulterende sekvens er

MKKNIAFLLNAYASPAPPAC.....CVRRA (SEKV. ID NR. 85)

15

hvor ledersekvensen er understreket og C.....C er Cys⁷-Cys¹⁵¹. Denne varianten ble konstruert for å tilveiebringe et tyrosin for radioaktiv jodering av TPO med hensyn på reseptor- og bio-

20 logiske studier.

(2) H8MLF - 7-rester fra STII-sekvensen, 8 histidin-rester og den enzymatiske faktor Xa-spaltingssekvens IEGR fusjoneres til det N-terminale domene (restene 1-155) i TPO. Sekvensen er

25

MKKNIAFHHHHHHHHIEGRSPAPPAC.....CVRRA (SEKV. ID NR. 86)

30

hvor ledersekvensen er understreket, og C.....C er Cys⁷-Cys¹⁵¹. Denne varianten kan, når den er renset og gjenfoldet, behandles med enzymet faktor Xa som vil spalte etter argininresten i sekvensen IEGR, hvorved man får en TPO-variant som er

35 155 rester lang, med en naturlig serin-N-terminal aminosyre.

(3) T-H8MLF - fremstilles som beskrevet ovenfor for variant (2), bortsett fra at en trombinfølsom sekvens IEPR fusjoneres til det N-terminale domene i TPO. Den resulterende

sekvens er

MKKNIAFHHHHHHHHIEPRSPAPPAC.....CVRRA (SEKV. ID
NR. 87)

5

hvor ledersekvensen er understreket, og C.....C er Cys⁷-Cys¹⁵¹. Denne varianten kan, etter rensing og gjenfolding, behandles med enzymet trombin for å frembringe en naturlig N-terminal variant av TPO som er 155 rester lang.

10

A.Gjenvinning, oppløseliggjøring og rensing av monomere, biologisk aktive TPO-varianten (1), (2) og (3)

15

Alle variantene ble uttrykt i *E. coli*. Flesteparten av variantene ble funnet i "refractile bodies" som observert i eksempel 22 for TPO (Met⁻¹ 1-153). Identiske fremgangsmåter for utvinningen, oppløseliggjøringen og rensingen av monomere TPO-varianten ble oppnådd som beskrevet i eksempel 22. Identiske gjenfoldingsbetingelser for de som ble brukt for TPO (Met⁻¹ 1-153), ble brukt med totalutbytter på 30-50%. Etter gjenfolding ble TPO-variantene renset ved hjelp av C4-reversfasekromatografi i 0,1% TFA under utnyttelse av en acetonitrilgradient som beskrevet tidligere. Alle TPO-variantene (i deres uproteolyserte former) hadde biologisk aktivitet som fastslått ved hjelp av Ba/F3-analysen, med halvmaksimale aktiviteter på 2-5 pM.

20

25

B.Proteolytisk bearbeiding av variantene (2) og (3) for å frembringe autentisk, N-terminalt TPO (1-155)

30

TPO-variantene (2) og (3) ovenfor ble utformet med et enzymatisk spaltbart lederpeptid før den normale, N-terminale aminosyrerest i TPO. Etter gjenfolding og rensing av variantene (2) og (3) som beskrevet ovenfor, ble hver underkastet fordøyelse med det passende enzym. For hver variant ble acetonitrilet fra C4-reversfasetrinnet fjernet ved å blåse en svak nitrogenstrøm på oppløsningen. Deretter ble de to variantene behandlet enten med faktor Xa eller trombin som beskrevet

35

nedenunder.

For TPO-variant (2) ble 1 M Tris-buffer, pH 8, tilsatt til den acetonitrilfrie oppløsning inntil en sluttkonsentrasjon på 50 mM, og pH-verdien ble regulert til 8 om nødvendig. NaCl og CaCl₂ ble tilsatt inntil henholdsvis 0,1 M og 2 mM. Faktor Xa (New England Biolabs) ble tilsatt for å oppnå et molforhold mellom enzym og variant på ca. 1:25 til 1:100. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i 1-2 timer for å oppnå maksimal spalting slik det ble fastslått ved hjelp av en endring i migrering på SDS-geler som utgjør tapet av ledersekvensen. Deretter ble reaksjonsblandingen rensset ved hjelp av C4-reversfasekromatografi under anvendelse av den samme gradient og de samme betingelser som beskrevet ovenfor for rensingen av korrekt foldede varianter. Uspaltet variant B ble separert fra spaltet variant (2) ved hjelp av disse betingelsene. De N-terminale aminosyrene ble påvist å være SPAPP, noe som indikerer at fjerning av den N-terminale ledersekvens var vellykket. Faktor Xa frembrakte også variable mengder av en indre spalting innenfor TPO-domenet; spalting ble observert etter argininresten i stillingsnr. 118, hvorved det ble frembrakt en ytterligere N-terminal sekvens TTAHKDP (SEKV. ID NR. 88). På ikke-reduserende SDS-geler ble det observert et enkeltbånd på omtrent 17 000 dalton for den spaltede faktor Xa-variant; på reducerende geler ble det sett to bånd med molekylvekt på omtrent 12 000 og 5 000 dalton, i overensstemmelse med spalting i arginin 118. Denne observasjonen bekreftet også at de to delene i molekylet ble holdt sammen ved hjelp av en disulfidbinding mellom den første og fjerde cysteinrest, slik som utledet fra de tryptiske fordøyelsesforsøk beskrevet ovenfor. Ved den biologiske Ba/F3-analyse hadde den rensede TPO-variant (1-155) etter fjerning av den N-terminale ledersekvens og med den indre spalting, en halvmaksimal aktivitet på 0,2-0,3 pikomol. Den intakte variant med ledersekvensen hadde en halvmaksimal aktivitet på 2-4 pikomol.

For variant (3) besto fordøyelsesbufferen av 50 mM Tris, pH 8, 2% CHAPS, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA og human- eller bovintrypsin (Calbiochem) ved et vektforhold mellom enzym og TPO-variantprotein på 1:25 til 1:50. Fordøyelsen ble utført

ved romtemperatur i 2-6 timer. Fordøyelsesforløpet ble fastslått ved hjelp av SDS-geler som beskrevet ovenfor for faktor Xa-spaltingsreaksjonen. Generelt ble det oppnådd mer enn 90% spalting av ledersekvensen på dette tidspunkt. Det resulterende TPO ble rensset på C4-reversfasekolonner som beskrevet ovenfor og ble påvist å ha den ønskede N-ende ved hjelp av aminosyresekvensering. Bare svært små (<5%) mengder av en indre spalting i den samme arginin-treoninbinding som observert ovenfor med faktor Xa, ble oppnådd. Det resulterende TPO-protein hadde høyere biologisk aktivitet med halvmaksimale responser i Ba/F3-analysen ved 0,2-0,4 pikomol protein. Ved den *mpl*-reseptorbaserte ELISA hadde dette protein en halvmaksimal respons ved 2-4 ng/ml rensset protein (120-240 pikomol), mens den intakte varianten som inneholdt ledersekvensen, var mindre sterk i begge analysene ved 5-10 ganger. For dyrestudier ble det HPLC-rensede, spaltede protein dialysert i fysiologisk akseptable buffere, med 150 mM NaCl, 0,01% "Tween 80" og 10 mM natriumsuccinat, pH 5,5 eller 10 mM natriumacetat, pH 5,5, eller 10 mM natriumfosfat, pH 7,4. Ved hjelp av HPLC- og SDS-geler var det rensede protein stabilt i flere uker når det ble lagret ved 4 °C. Hos normale og myeloundertrykte mus var dette rensede TPO med den autentiske, N-terminale sekvens svært aktivt, idet den stimulerte produksjonen av blodplater ved så lave doser som 30 ng/mus.

Eksempel 24

Syntetisk *mpl*-ligand

Selv om human-*mpl*-ligand (hML) vanligvis lages ved å anvende rekombinante metoder, kan den også syntetiseres via enzymatisk ligering av syntetiske peptidfragmenter under anvendelse av metoder beskrevet nedenunder. Syntetisk fremstilling av hML muliggjør inkorporering av unaturlige aminosyrer eller syntetiske funksjonaliteter, slik som polyetylenglykol. Tidligere ble en mutant av serinproteasesubtilisin BPN, subtiligase (S221C/P225A), bearbeidet for effektivt å ligere peptidestere i vandig oppløsning (Abrahmsen et al., Biochem., 30:4151-4159. (1991)). Det er nå blitt påvist at syntetiske

peptider kan liggeres enzymatisk på en sekvensvis måte for å fremstille enzymatisk aktive, lange peptider og proteiner, slik som ribonuklease A (Jackson et al., Science, (1994)). Denne teknikken som er beskrevet nærmere nedenunder, har gjort
5 det mulig for oss å syntetisere kjemisk lange proteiner som tidligere bare kunne lages ved hjelp av teknikk med rekombinant DNA.

En generell strategi for hML₁₅₃-syntese under anvendelse av subtiligase er vist (reaksjonsskjema 1). Ved å begynne med et fullstendig avbeskyttet peptid som tilsvarer det
10 C-terminale fragment i proteinet, adderes et N-terminalt beskyttet, C-terminalt aktivert esterpeptid sammen med subtiligase. Etter at reaksjonen er fullstendig, isoleres produktet ved hjelp av reversfase-HPLC, og beskyttelsesgruppen fjernes
15 fra N-enden. Det neste peptidfragment liggeres, avbeskyttes, og fremgangsmåten gjentas ved å bruke suksessive peptider inntil fullengdeprotein er oppnådd. Fremgangsmåten er lik fastfase-metodikk ved at et N-terminalt beskyttet, C-terminalt aktivert peptid liggeres til N-enden av det forutgående peptid, og pro-
20 tein syntetiseres i en C→N-retning. Ettersom hver kobling resulterer i addisjon av opptil 50 rester og produktene isoleres etter hver ligering, kan imidlertid mye lengre, høyrensede proteiner syntetiseres i rimelige utbytter.

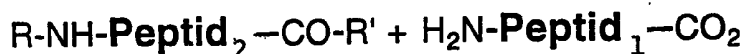
25

30

35

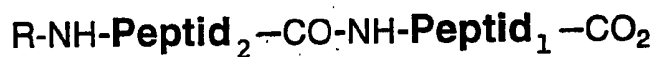
Reaksjonsskjema 1Strategi for syntese av hML under anvendelse av subtiligase

5

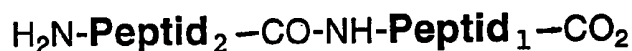


↓ 1) Subtiligase

10



↓ 2) Zn/CH₃CO₂H

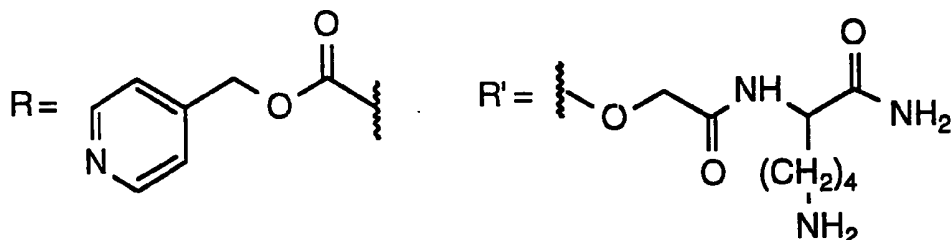


15

↓ 3) gjenta 1 + 2



20



25

Basert på vår kunnskap om subtiligasens sekvensspesifisitet samt aminosyresekvensen til det biologisk aktive "epodomene" i hML, delte vi opp hML₁₅₃ i syv fragmenter med 18-25 resters lengde. Testligerings-tetrapeptidet ble syntetisert for å bestemme egnede ligeringssammenknytningspunkter for 18-25-merene. Tabell 13 viser resultatene av disse testligeringer.

35

Tabell 13

hML-testligeringer

Donor- og nukleofilpeptider ble oppløst i 10 mM i 100 mM tricin (pH 7,8) ved 22 °C. Ligase ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10 µM fra en 1,6 mg/ml standard (ca. 70 µM), og ligeringen fikk forløpe over natten. Utbytter er basert på % ligering vs. hydrolyse av donorpeptidene.

Sete	Donor (glc-K-NH ₂)	Nukleofil -NH ₂	%Hydrolyse	%Ligering
1 (23/24)	HVLH (SEKV. ID NR. 89)	SRLS (SEKV. ID NR. 90)	92	08
(22/23)	SHVL (SEKV. ID NR. 91)	HSRL (SEKV. ID NR. 92)	48	52
2 (46/47)	AVDF (SEKV. ID NR. 93)	SLGE (SEKV. ID NR. 94)	22	78
3 (69/70)	AVTL (SEKV. ID NR. 95)	LLEG (SEKV. ID NR. 96)	53	47
4 (89/90)	LSSL (SEKV. ID NR. 97)	LGQL (SEKV. ID NR. 98)	95	05
(88/89)	C(acm)LSS (SEKV. ID NR. 99)	LLGQ (SEKV. ID NR. 100)	00	00
(90/91)	SLL (SEKV. ID NR. 101)	GQLS (SEKV. ID NR. 102)	45	55
(88/89)	CLSS (SEKV. ID NR. 103)	LLGQ (SEKV. ID NR. 100)	90	10
5 (107/108)	LQSL (SEKV. ID NR. 104)	LGTQ (SEKV. ID NR. 105)	99	01
(106/107)	ALQS (SEKV. ID NR. 106)	LLGT (SEKV. ID NR. 107)	70	30
6 (128/129)	NAIF (SEKV. ID NR. 108)	LSFQ (SEKV. ID NR. 109)	60	40

Basert på disse forsøk, bør ligeringspeptidene angitt i tabell 14, bli effektivt ligert av subtiligase. En egnet

beskyttelsesgruppe for N-enden av hvert donoresterpeptid var nødvendig for å forhindre selvlisering. Vi valgte en isonikotinylnylbeskyttelsesgruppe (iNOC) (Veber et al., J. Org. Chem., 42:3286-3289 (1977)) ettersom den er vannoppløselig, og den kan inkorporeres i det siste trinn i fastfasepeptidsyntesen, og den er stabil overfor vannfritt HF brukt til å avbeskytte og spalte peptider fra fastfaseharpiksen. I tillegg kan den fjernes fra peptidet etter hver ligering under milde, reduserende betingelser ($\text{Zn}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), hvorved man får en fri N-ende for etterfølgende ligeringer. En glykolat-lysyl-amid- (glc-K-NH₂-) ester ble brukt for C-terminal aktivering basert på tidligere forsøk som viste at denne ble effektivt acylert av subtiligase (Abrahmsen et al., Biochem., 30:4151-4159 (1991)). De iNOC-beskyttede, glc-K-amidaktiverte peptider kan syntetiseres under anvendelse av standard fastfasemetoder som skissert (reaksjonsskjema 2). Peptidene liggeres så sekvensvis inntil hele proteinet er fremstilt, og sluttproduktet gjenfoldes *in vitro*. Basert på homologi med EPO, antas disulfidpar å bli dannet mellom cysteinrestene 7 og 151 og mellom 28 og 85. Oksidasjon av disulfidene kan utføres ganske enkelt ved å omrøre det reduserte materiale under oksygenatmosfære i flere timer. Det gjenfoldede materiale kan så renses ved hjelp av HPLC, og fraksjoner som inneholder aktivt protein, slås sammen og lyofiliseres. Som et alternativ kan disulfider beskyttes differensielt for å kontrollere sekvensvis oksidasjon mellom spesifikke disulfidpar. Beskyttelse av cysteinene 7 og 151 med acetamidometylgrupper (acm) vil sikre oksidasjon av 28 og 85. Acm-gruppene kan så fjernes, og restene 7 og 151 oksideres. Omvendt vil restene 28 og 85 kunne acm-beskyttes og oksideres i tilfelle sekvensvis oksidasjon er påkrevet for korrekt folding. Eventuelt vil cysteinene 28 og 85 kunne byttes ut med en annen naturlig eller unaturlig rest enn Cys for å sikre korrekt oksidasjon av cysteinene 7 og 151.

Tabell 14
Peptidfragmenter brukt for totalsyntese av h-ML
under anvendelse av subtiligase

5	<u>Fragment</u>
	<u>Sekvens</u>
	1 (SEKV. ID NR. 110) iNOC-HN-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL-glc-K-NH ₂ (1-22)
10	2 (SEKV. ID NR. 111) iNOC-HN-HSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDF-glc-K-NH ₂ (23-46)
	3 (SEKV. ID NR. 112) iNOC-HN-SLGEWKTQMEETKAQDILGAVTL-glc-K-NH ₂ (47-69)
15	4 (SEKV. ID NR. 113) iNOC-HN-LLEGVMAARGQLGPTCLSSLL-glc-K-NH ₂ (70-90)
	5 (SEKV. ID NR. 114) iNOC-HN-GQLSGQVRLLLGALQS-glc-K-NH ₂ (90-106)
20	6 (SEKV. ID NR. 115) iNOC-HN-LLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIF-glc-K-NH ₂ (107-128)
25	7 (SEKV. ID NR. 116) H ₂ N-LSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR-CO ₂ (129-153)

Peptidligeringer utføres ved 25 °C i 100 mM tricin, pH 8 (nyfremstilt og avgasset ved hjelp av vakuumfiltrering gjennom et 5 µM filter). Vanligvis oppløses det C-terminale fragment i buffer (2-5 mM peptid), og en 10x standardoppløsning av subtiligase (1 mg/ml i 100 mM tricin, pH 8) tilsettes for å bringe sluttenzymkonsentrasjonen til ca. 5 µM. Et 3-5 molart overskudd av det glc-K-NH₂-aktiverte donorpeptid tilsettes så som et fast stoff, oppløses, og blandingen får stå ved 25 °C. Ligeringene overvåkes ved hjelp av analytisk reversfase-C18-HPLC (CH₃CN/H₂O-gradient med 0,1% TFA). Ligeringsproduktene renses ved hjelp av preparativ HPLC og lyofil-

iseres. Isonikotinylavbeskyttelse (iNOC-avbeskyttelse) ble utført ved å omrøre HCl-aktivert sinkstøv med det beskyttede peptid i eddiksyre. Sinkstøvet fjernes ved filtrering, og eddiksyren avdampes under vakuum. Det resulterende peptid kan
5 brukes direkte i den neste ligering, og fremgangsmåten gjentas. Syntetisk hML₁₅₃ kan ligeres ved hjelp av fremgangsmåter som er analoge med de som er beskrevet ovenfor, til syntetisk eller rekombinant hML₁₅₄₋₃₃₂ for å fremstille syntetisk eller semisyntetisk fullengde-hML.

10 Syntetisk hML har mange fordeler sammenlignet med rekombinant. Unaturlige sidekjeder kan innføres for å forbedre styrke eller spesifisitet. Polymerfunksjonaliteter slik som polyetylenglykol, kan inkorporeres for å forbedre virkningsvarighet. For eksempel kan polyetylenglykol festes til lysin-
15 rester i de enkelte fragmenter (tabell 14) før eller etter ett eller flere ligeringstrinn er blitt utført. Proteasefølsomme peptidbindinger kan fjernes eller endres for å forbedre stabilitet *in vivo*. I tillegg kan tungatomderivater syntetiseres for å hjelpe til ved strukturbestemmelse.

20

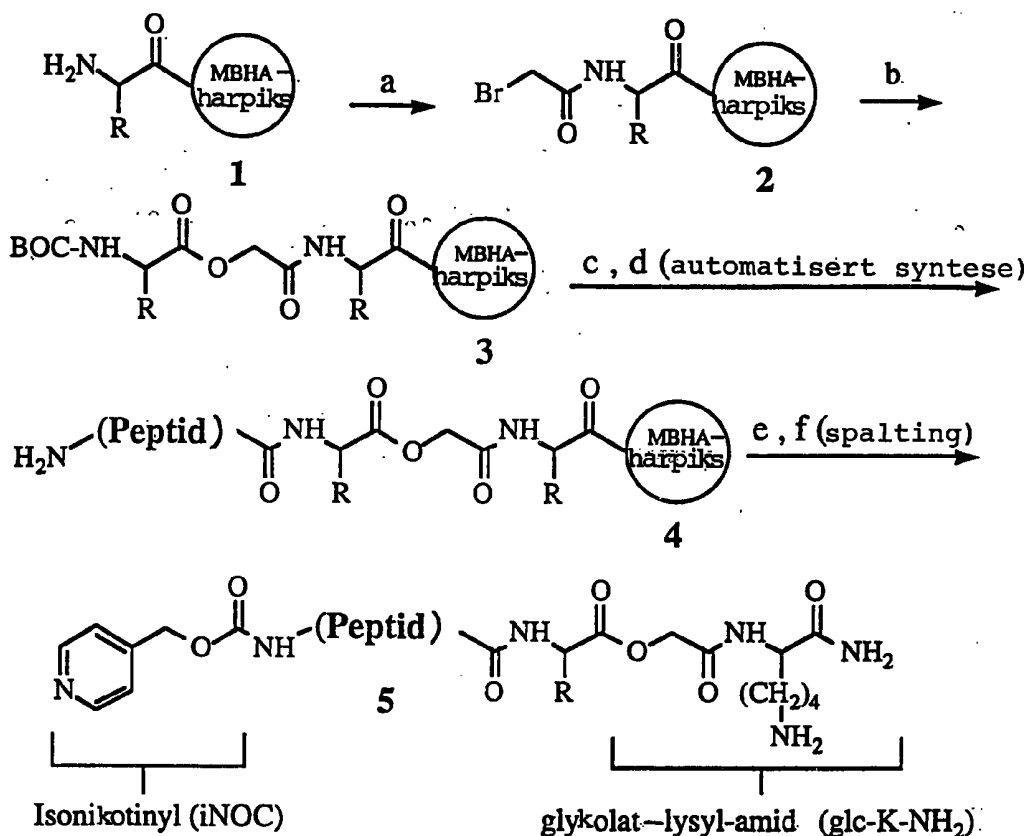
25

30

35

Reaksjonsskjema 2

Fastfasesyntese av peptidfragmenter for segmentligering



a) Lysyl-parametylbenzhydrylamin- (MBHA-) harpiks 1
 (0,63 mekv./g, Advanced ChemTech) omrøres med bromeddiksyre
 (5 ekv.) og diisopropylkarbodiimid (5 ekv.) i 1 time ved 25 °C
 i dimetylacetamid (DMA), hvorved man får bromacetylderivatet
 2. b) Harpiksen vaskes grundig med DMA, og individuelle, Boc-
 beskyttede aminosyrer (3 ekv., Bachem) forestres ved omrøring
 med natriumbikarbonat (6 ekv.) i dimetylformamid (DMF) i
 24 timer ved 50 °C, hvorved man får den tilsvarende glykolat-
 fenylalanylamidharpiksen 3. Den aminoacetylerede harpiks 3
 vaskes med DMF (3x) og diklormetan (CH₂Cl₂) (3x) og kan lagres

ved romtemperatur i flere måneder. Harpiksen 3 kan så fylles i et automatisert peptidsynteseapparat (Applied Biosystems 430A) og peptidene forlenges ved å bruke standard fastfasefremgangsmåter (5). c) N- α -Boc-gruppen fjernes med en oppløsning av 45% trifluoreddiksyre i CH₂Cl₂. d) Etterfølgende Boc-beskyttede aminosyrer (5 ekv.) foraktiveres under anvendelse av benzo-triazol-yl-oksy-tris-(dimetyl-amino)-fosfoniumheksafluorfosfat (BOP, 4 ekv.) og N-metylmorfolin (NMM, 10 ekv.) i DMA og kobles i 1-2 timer. e) Slutt-N- α -Boc-gruppen fjernes (TFA/CH₂Cl₂), hvorved man får 4, og isonikotinylbeskyttelsesgruppen (iNOC-beskyttelsesgruppen) innføres som beskrevet tidligere (4) via omrøring med 4-isonikotinyl-2-4-dinitrofenylkarbonat (3 ekv.) og NMM (6 ekv.) i DMA ved 25 °C i 24 timer. f) Spalting og avbeskyttelse av peptidet via behandling med vannfritt HF (5% anisol/5% etylmetylsulfid) ved 0 °C i 1 time gir det iNOC-beskyttede, glykolat-lys-amid-aktiverte peptid 5 som renses ved hjelp av reversfase-C18-HPLC (CH₃CN/H₂O-gradient, 0,1% TFA). Identiteten til alle substratene bekreftes ved hjelp av massespektrometri.

20

Supplement til reproduserbarhet

Oppfinnelsen er, slik den er krevet, reproduserbar i overensstemmelse med den ovenfor angitte beskrivelse og lett tilgjengelige referanser og utgangsmaterialer. Ikke desto mindre har søkeren deponert ved American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC), cellelinjene angitt neden-

Escherichia coli, DH10B-pBSK-hm_{pl} I 1,8, ATCC deponeringsnr. CRL 69575, deponert 24. februar 1994.

30 Plasmid, pSVI5.ID.LL.MLORF, ATCC deponeringsnr. CRL 75958, deponert 2. desember 1994, og

CHO DP-12-celler, ML 1/50 MCB (merket nr. 1594), ATCC deponeringsnr. CRL 11770, deponert 6. desember 1994.

Denne deponeringen ble gjort under bestemmelsene i Budapestkonvensjonen om internasjonal anerkjennelse av deponeringer av mikroorganismer i forbindelse med behandling av patentsaker, og forskriftene under denne (Budapestkonvensjonen). Denne sikrer opprettholdelse av en levedyktig kultur

i 30 år fra deponeringsdato. Organismene vil bli gjort tilgjengelige av ATCC under bestemmelsene i Budapestkonvensjonen, og i henhold til en avtale mellom søkerne og ATCC som sikrer ubegrenset tilgjengelighet etter bevilgning av det aktuelle
s US-patent. Tilgjengelighet av deponert stamme skal ikke oppfattes som en lisens til å utøve oppfinnelsen i strid med rettighetene bevilget under enhver statlig myndighet i overensstemmelse med dens patentlover.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5 (i) SØKER: Genentech Inc.

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Trombopoietin

10 (iii) ANTALL SEKVENSER: 144

(v) COMPUTER-LESBAR FRA:

(A) MEDIUMTYPE: 5,25 tommer, 360 Kb "floppy disk"

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) DRIFTSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

15 (D) PROGRAMVARE: patin (Genentech)

(vi) RELEVANTE SØKNADSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: 962783

(B) INNLEVERINGSDATO: 2. juli 1996

20 (C) KLASSIFIKASJON:

(vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/176553

(B) INNLEVERINGSDATO: 3. januar 1994

25

(vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/348657

(B) INNLEVERINGSDATO: 02-des-1994

30 (vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/185607

(B) INNLEVERINGSDATO: 21-jan-1994

(vii) PRIORITETSDATA:

35

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/348658

(B) INNLEVERINGSDATO: 02-des-1994

(vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/196689

(B) INNLEVERINGSDATO: 15-feb-1994

(vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/223263

5 (B) INNLEVERINGSDATO: 04-apr-1994

(vii) PRIORITETSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: US 08/249376

10 (B) INNLEVERINGSDATO: 25-mai-1994

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 1:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

15 (A) LENGDE: 353 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: linear

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 1:

20

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

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

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

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val
50 55 60

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
65 70 75

30 Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
80 85 90

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
95 100 105

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu
110 115 120

35

Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro
125 130 135

Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu
140 145 150

	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	
					155					160					165	
	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	
					170					175					180	
5	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	
					185					190					195	
	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	
					200					205					210	
10	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	
					215					220					225	
	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	
					230					235					240	
	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn	
					245					250					255	
15	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	
					260					265					270	
	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	
					275					280					285	
	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro	
					290					295					300	
20	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	
					305					310					315	
	Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	
					320					325					330	
	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	His	
25					335					340					345	
	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly								
					350			353								

30 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 2:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 1795 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

35 (C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 2:

TCTTCCTACC CATCTGCTCC CCAGAGGGCT GCCTGCTGTG CACTTGGGTC 50
CTGGAGCCCT TCTCCACCCG GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG 100
5 CCCCACCCTA CTCTGCCCAG AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC 150
CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA 200
GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT 250
10 TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGTG 300
ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC 350
15 AGACTGAGCC AGTGCCCAAG GGTTCACCCT TTGCCTACAC CTGTCTGCT 400
GCCTGCTGTG GACTTTAGCT TGGGAGAATG GAAAACCCAG ATGGAGGAGA 450
CCAAGGCACA GGACATTCTG GGAGCAGTGA CCCTTCTGCT GGAGGGAGTG 500
20 ATGGCAGCAC GGGGACAACT GGGACCCACT TGCCTCTCAT CCCTCCTGGG 550
GCAGCTTTCT GGACAGGTCC GTCTCCTCCT TGGGGCCCTG CAGAGCCTCC 600
TTGGAACCCA GCTTCTCTCA CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGATCCC 650
25 AATGCCATCT TCCTGAGCTT CCAACACCTG CTCCGAGGAA AGGTGCGTTT 700
CCTGATGCTT GTAGGAGGGT CCACCCTCTG CGTCAGGCGG GCCCCACCCA 750
CCACAGCTGT CCCCAGCAGA ACCTCTCTAG TCCTCACACT GAACGAGCTC 800
30 CCAAACAGGA CTTCTGGATT GTTGGAGACA AACTTCACTG CCTCAGCCAG 850
AACTACTGGC TCTGGGCTTC TGAAGTGGCA GCAGGGATTG AGAGCCAAGA 900
TTCTTGCTCT GCTGAACCAA ACCTCCAGGT CCCTGGACCA AATCCCCGGA 950
TACCTGAACA GGATACACGA ACTCTTGAAT GGAACTCGTG GACTCTTTCC 1000

TGGACCCTCA CGCAGGACCC TAGGAGCCCC GGACATTTCC TCAGGAACAT 1050
CAGACACAGG CTCCCTGCCA CCCAACCTCC AGCCTGGATA TTCTCCTTCC 1100
5 CCAACCCATC CTCCTACTGG ACAGTATACG CTCTTCCCTC TTCCACCCAC 1150
CTTGCCCACC CCTGTGGTCC AGCTCCACCC CCTGCTTCCT GACCCTTCTG 1200
CTCCAACGCC CACCCCTACC AGCCCTCTTC TAAACACATC CTACACCCAC 1250
10 TCCCAGAATC TGTCTCAGGA AGGGTAAGGT TCTCAGACAC TGCCGACATC 1300
AGCATTGTCT CATGTACAGC TCCCTTCCCT GCAGGGCGCC CCTGGGAGAC 1350
15 AACTGGACAA GATTTCTTAC TTTCTCCTGA AACCCAAAGC CCTGGTAAAA 1400
GGGATACACA GGA CTGAAAA GGAATCATT TTCTACTGTA CATTATAAAC 1450
CTTCAGAAGC TATTTTTTTA AGCTATCAGC AATACTCATC AGAGCAGCTA 1500
20 GCTCTTTGGT CTATTTTCTG CAGAAATTG CAACTCACTG ATTCTCTACA 1550
TGCTCTTTTT CTGTGATAAC TCTGCAAAGG CCTGGGCTGG CCTGGCAGTT 1600
GAACAGAGGG AGAGACTAAC CTTGAGTCAG AAAACAGAGA AAGGGTAATT 1650
25 TCCTTTGCTT CAAATTCAAG GCCTTCCAAC GCCCCCATCC CCTTTACTAT 1700
CATTCTCAGT GGGACTCTGA TCCCATATTC TTAACAGATC TTTACTCTTG 1750
30 AGAAATGAAT AAGCTTTCTC TCAGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 1795

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 3:

- 35 (1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 42 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 3:

Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 5 Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys
 20 25 30
 Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu
 35 40 42

10

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 4:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 390 baser
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅD: enkelttrådet
 (D) TOPOLOGI: lineær

15

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 4:

20

GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT 50

CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT 100

25 GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGTG ACCTCCGAGT 150

CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA 200

GAACTCCCAA CATTATCCCC TTTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA 250

30

CTCCCAGGAA GACACCATCA CTCCTCTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT 300

TCTTCCATA TTGTCCCCAC CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT 350

TCTTCACAAT ACAGCCCACA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA 390

35

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 5:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 390 baser
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅD: enkelttrådet
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 5:

10

CTTAAGGACC TTATGGTCGA CTGTTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA 50

GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA 100

15

CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA 150

GGAGTCATTT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTCTG TCTGACCACT 200

CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AAATAGGCGC ATTGACCATT CTGTGGGTAT 250

20

GAGGGTCCTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAACTGG GTTACTGATA 300

AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA 350

AGAAGTGTTA TGTGGGGCGT AAATTTTCGA GAGCAGATCT 390

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 6:

30

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 332 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 6:

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

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

Glu Gly
332

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 7:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 166 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 7:

10 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala
 20 25 30
 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys
 35 40 45
 15 Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
 50 55 60
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu
 65 70 75
 Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro
 20 80 85 90
 Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
 95 100 105
 Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
 110 115 120
 25 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala
 125 130 135
 Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
 140 145 150
 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 155 160 165
 30 Arg
 166

35 (2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 8:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 328 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 8:

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

Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser
 260 265 270
 Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro
 275 280 285
 5 Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
 290 295 300
 Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn
 305 310 315
 10 Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 320 325 328

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 9:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 15 (A) LENGDE: 265 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 9:

20

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

Ser Gln Asn Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Glu Val Ala Ala Gly Ile
 155 160 165
 Gln Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln Val Pro
 170 175 180
 5 Gly Pro Asn Pro Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Leu Glu
 185 190 195
 Trp Asn Ser Trp Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp Pro Arg
 200 205 210
 Ser Pro Gly His Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro Ala
 10 215 220 225
 Thr Gln Pro Pro Ala Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser
 230 235 240
 Tyr Trp Thr Val Tyr Ala Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His
 245 250 255
 15 Pro Cys Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ser
 260 265

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 10:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 261 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 10:

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

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
 95 100 105
 Ser Leu Leu Gly Thr Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro
 110 115 120
 5 Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Asp
 125 130 135
 Phe Trp Ile Val Gly Asp Lys Leu His Cys Leu Ser Gln Asn Tyr
 140 145 150
 Trp Leu Trp Ala Ser Glu Val Ala Ala Gly Ile Gln Ser Gln Asp
 155 160 165
 10 Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln Val Pro Gly Pro Asn Pro
 170 175 180
 Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Leu Glu Trp Asn Ser Trp
 185 190 195
 Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp Pro Arg Ser Pro Gly His
 200 205 210
 15 Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro Ala Thr Gln Pro Pro
 215 220 225
 Ala Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser Tyr Trp Thr Val
 230 235 240
 20 Tyr Ala Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His Pro Cys Gly Pro
 245 250 255
 Ala Pro Pro Pro Ala Ser
 260 261

25 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 11:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 7849 baser
 (B) TYPE: nukleinsyre
 30 (C) TRÅD: enkelttrådet
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 11:

35 CCCAGCCTCC TTTCTCTTGT TCCCTGGTCA TGCCTGCCTC CCTGTCTCCT 50

GTCTCTCCCT CCCACACACA CCCACTATCC TCCCAGCTAT CCCTACACCC 100

TCCTTCCTAA TCTTGGGAGA CATCTCGTCT GGCTGGACGG GAAAATTCCA 150

GGATCTAGGC CACACTTCTC AGCAGACATG CCCATCCTTG GGGAGGAGGA 200
ACAGGAGAGA GCCTGAGGAA GTTCTGGGGG ACAGGGGGAT GATGGGATCA 250
5 AGGTCAGGCC AGGAAGCCCC TGAGGACAGA GACTGTGGGG AGACTGGGAC 300
TGGGAAGAAA GCAAAGGAGC TAGAGCCAGG GCCAAAGGAA AAGGGGGGCC 350
AGCAGGGAGG TATTTGCGGG GGAGGTCCAG CAGCTGTCTT TCCTAAGACA 400
10 GGGACACATG GGCCTGGTTA TTCCTCTTGT CACATGTGGA ACGGTAGGAG 450
ATGGAAGACG GAGACAGAAC AAGCAAAGGA GGGCCCTGGG CACAGAGGTC 500
15 TGTGTGTGTA GCCATCCAAG CCACTGGACC CCAGCAGACG AGCACCTAAG 550
CTCAGGCTTA ACCCAGTGCA CGTGTGCGCA CATACTGTG CCCCACCT 600
GACAGTCCAC TCAACCCGTC CAAACCCTTT CCCATAACA CCAACCCATA 650
20 ACAGGAGATT TCTCTCATGT GGGCAATATC CGTGTTCCTA CTTGAAAGG 700
GGGAATGACA AGATAGGACT CCCTAGGGGA TTACAGAAAG AAAAGCAGGA 750
AAGCAAGCAT CCTGTTGGAT TTCAGCAGCA GGTATGATGT CCAGGGAAAA 800
25 GAAATTTGGA TAGCCAGGGA GTGAAAACCC CACCAATCTT AAACAAGACC 850
TCTGTGCTTC TTCCCCAGCA ACACAAATGT CCTGCCAGAT TCCTCCTGGA 900
AAAAAACTTC TGCTCCTGTC CCCCTCCAGG TCCCAGGTTG CCCATGTCCA 950
30 GGAAAAGATG GATCCCECTA TCCAAATCTT CTCCGTGGTG TGTGTGGGTG 1000
GAGGAGTGGA CCCTGGTCCA GGCAGGGGCT CCAGGGAAGA GAAGGCGTCA 1050
35 CTTCCGGGGG CCTTCACCAG TGTCTGGTGG CTCCCTTCTC TGATTGGGCA 1100
GAAGTGGCCC AGGCAGGCGT ATGACCTGCT GCTGTGGAGG GGCTGTGCCC 1150

CACCGCCACA TGTCTTCCTA CCCATCTGCT CCCCAGAGGG CTGCCTGCTG 1200
 TGCACCTGGG TCCTGGAGCG CTTCTCCACC CGGTGAGTGG CCAGCAGGGT 1250
 5 GTGGGGTTAT GTGAGGGTAG AAAGGACAGC AAAGAGAAAT GGGCTCCCAG 1300
 CTGGGGGAGG GGCAGGCAAA CTGGAACCTA CAGGCACTGA CCTTTGTCGA 1350
 GAAGAGTGTA GCCTTCCCAG AATGGGAGGA GCAGGGCAGA GCAGGGGTAG 1400
 10 GGGGTGGGGT GCTGGTTTCT GAGGGACTGA TCACTTACTT GGTGGAATAC 1450
 AGCACAGCCC TGGCTGGCCC TAAGGAAAGG GGACATGAGC CCAGGGAGAA 1500
 15 AATAAGAGAG GGAGCTGCAC TTAGGGCTTA GCAAACACAG TAGTAAGATG 1550
 GACACAGCCC CAATCCCCAT TCTTAGCTGG TCATTCCCTG TTAGCTTAAG 1600
 GTTCTGAATC TGGTGCTGGG GAAGCTGGGC CAGGCAAGCC AGGGCGCAAG 1650
 20 GAGAGGGTAA TGGGAGGAGG GCCCACTCAT GTTGACAGAC CTACAGGAAA 1700
 TCCCAATATT GAATCAGGTG CAAGCCTCTT TGCACAACCT GTGAAAGGAG 1750
 GAGGAAGCCA TGTGGGGGGT CCTGTGAAGG AACCGGAAGG GGTCTTGCCA 1800
 25 AGGGGGCAGG GAGGCAGGTG TGAGCTATGA GACAGATATG TTAGTGGGCG 1850
 CCTAAGACAA GGTAAGCCCC TAAGGTGGGC ATCACCAGC AGGTGCCCCG 1900
 30 TCCTGGGCAG CTGGTCTCAG GAAGGAAGTC CCAGAACTGT TAGCCCATCT 1950
 CTTGGCCTCA GATAATGGAG TATTTAGGA CTTGGAGTCC AAAGAAAAGC 2000
 TCCAGTGGCT TTATGTGTGG GGGTAGATAG GGAAAGAATA GAGGTTAAT 2050
 35 TCTCCATAC CGCCTTTTAA TCCTGACCTC TAGTGGTCCC AGTTACAGCT 2100
 TTGTGCAGTT CCCCTCCCCA GCCCCACTCC CCACCGCAGA AGTTACCCCT 2150

CAACATATTG CGCCCGTTTG CCAGTTCCTC ACCCAGGCCC TGCATCCCAT 2200

TTTCCACTCT CTTCTCCAGG CTGAAGCCAC AATACTTTCC TTCTCTATCC 2250

5 CCATCCCAGA TTTTCTCTGA CCTAACAACC AAGGTTGCTC AGAATTTAAG 2300

GCTAATTAAG ATATGTGTGT ATACATATCA TGTCCTGCTG CTCTCAGCAG 2350

GGGTAGGTGG CACCAAATCC GTGTCCGATT CACTGAGGAG TCCTGACAAA 2400

10 AAGGAGACAC CATATGCTTT CTTGCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTTT 2450

TTTTTTTTGA GACGGAGTTT CACTCTTATT GCCCAGGCTG GAGTGCAATG 2500

15 GTGCGATCTC GGCTCACCAC AAACCTCCGC CTCCCAGGTA CAAGCGATTC 2550

TCCTGTCTCA GCCTCCCAAG TAGCTTGGAT TACAGGCATG AGCCACCACA 2600

CCCTGCTAGT TTTTTTGTAT TTCGTAGAGC CGGGGTTTCA CCATGTTAGT 2650

20 GAGGCTGGTG GCGAACTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTTGGA CTC 2700

CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCATGAGCCA CTGCACCCGG CACACCATAT 2750

GCTTTCATCA CAAGAAAATG TGAGAGAATT CAGGGCTTTG GCAGTTCCAG 2800

25 GCTGGTCAGC ATCTCAAGCC CTCCCCAGCA TCTGTTCACT CTGCCAGGCA 2850

GTCTCTTCCT AGAAACTTGG TTAAATGTTT ACTCTTCTTG CTACTTTCAG 2900

GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG CCCCACCCTA CTCTGCCCAG 2950

30 AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA 3000

GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA GACACCCCGG CCAGAATGGA 3050

35 GCTGACTGGT GAGAACACAC CTGAGGGGCT AGGGCCATAT GGAAACATGA 3100

CAGAAGGGGA GAGAGAAAGG AGACACGCTG CAGGGGGCAG GAAGCTGGGG 3150

GAACCCATTC TCCCAAAAAT AAGGGGTCTG AGGGGTGGAT TCCCTGGGTT 3200
TCAGGTCTGG GTCCTGAATG GGAATTCCTG GAATACCAGC TGACAATGAT 3250
5 TTCCTCCTCA TCTTTCAACC TCACCTCTCC TCATCTAAGA ATTGCTCCTC 3300
GTGGTCATGC TTCTCCTAAC TGCAAGGCTA ACGCTGTCCA GCCCGGCTCC 3350
TCCTGCTTGT GACCTCCGAG TCCTCAGTAA ACTGCTTCGT GACTCCCATG 3400
10 TCCTTCACAG CAGACTGGTG AGAATCCCA ACATTATCCC CTTTATCCGC 3450
GTAAC TGGTA AGACACCCAT ACTCCCAGGA AGACACCATC ACTTCCTCTA 3500
15 ACTCCTTGAC CCAATGACTA TTCTTCCCAT ATTGTCCCCA CCTACTGATC 3550
ACACTCTCTG ACAAGAATTA TTCTTCACAA TACAGCCCGC ATTTAAAAGC 3600
TCTCGTCTAG AGATAGTACT CATGGAGGAC TAGCCTGCTT ATTAGGCTAC 3650
20 CATAGCTCTC TCTATTTCAG CTCCCTTCTC CCCCCACCAA TCTTTTCAA 3700
CAGAGCCAGT GCCCAGAGGT TCACCCTTTG CCTACACCTG TCCTGCTGCC 3750
TGCTGTGGAC TTTAGCTTGG GAGAATGGAA AACCAGATG GTAAGAAAGC 3800
25 CATCCCTAAC CTGGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT CCCACTGCTT 3850
CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAATAT CTCACCTTCA 3900
GCTTGGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG 3950
30 ATAAGATGAT GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTG GAAGCTGAAC 4000
ACCATGAAAA GCTGGAGAGA AATCGCTCAT GGCATGCCT TTGACCTATT 4050
35 CCYGTTCAGT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG AAGCAAGACT CATATGTCAT 4100
CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC AAAAGACTGA 4150

ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC 4200
AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAATCCCA 4250
5 GCACTTTGGG AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG 4300
AGCAGCCTGG CCAACATGGC GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAAAAT 4350
TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT CCCAGCTACT TGGAAGGCTG 4400
10 AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA GTGAGCTGAG 4450
ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA 4500
AAAAGAAAA AAAATCTAC ATGTGTAAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC 4550
15 CAGCTTTCAG GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT 4600
AGCACTTCCT ACGAAAAGGA TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA 4650
20 CCATGTAACA TTAAGTGAAGC TGCTATTCTT AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT 4700
GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA GAACTCTATT 4750
CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 4800
25 GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAAC TAACATGTGT 4850
CTAGAAAGCA GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG 4900
CAATAGTTTA AAAAATAAAA ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTTC 4950
30 TTCCTTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG CAGTTCCTAT GGGTCCCTTC 5000
TAGTCCTTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT CTCATACCTA 5050
35 CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 5100
CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCAGTCAA CCTCAGCCTC 5150

CCGGATTCAA GCGATTCTCC TGCCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC 5200

AGGTGCCCCAC CACCATGCCC AGCTAATTTT TGTATTTTGT GTAGAGATGG 5250

5 GGTTCACCA TGTGGCCAG GCTGATCTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT 5300

CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACTG 5350

10 CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG 5400

CAGAAAGAGT AAATTGTCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA 5450

GGGCAGATTT CAGCAACGTA AGAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA 5500

15 AGTGTAAGAC CAGGCTGGAC TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG 5550

CTGATGACCA GCTGTCGGA GACTGTGAAG GAATTCCTGC CCTGGGTGGG 5600

ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCATC TGCTGGCTAC 5650

20 TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTTGAGG CAGTGCCTT 5700

CTCTCTTCCA TCTCTTCTC AGGAGGAGAC CAAGGCACAG GACATTCTGG 5750

GAGCAGTGAC CTTCTGCTG GAGGGAGTGA TGGCAGCACG GGGACAACTG 5800

25 GGACCCACTT GCCTCTCATC CCTCCTGGGG CAGCTTTCTG GACAGGTCCG 5850

TCTCCTCCTT GGGGCCCTGC AGAGCCTCCT TGGAACCCAG GTAAGTCCCC 5900

30 AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCACTAGAA 5950

GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG 6000

ATCTACTAAG AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC 6050

35 TGTCTTTCCT ACTTAGACAA GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG 6100

GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAGCTTC CTCCACAGGG CAGGACCACA 6150

GCTCACAAGG ATCCCAATGC CATCTTCCTG AGTTTCCAAC ACCTGCTCCG 6200

AGGAAAGGTG CGTTTCCTGA TGCTTG TAGG AGGGTCCACC CTCTGCGTCA 6250

5 GCGGGGCCCC ACCCACCACA GCTGTCCCCA GCAGAACCTC TCTAGTCCTC 6300

AACTGAACG AGCTCCCAA CAGGACTTCT GGATTGTTGG AGACAACTT 6350

10 CACTGCCTCA GCCAGAACTA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG TGGCAGCAGG 6400

GATTCAGAGC CAAGATTCTT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGGTCCCTG 6450

GACCAAATCC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC 6500

15 TCGTGGACTC TTTCTCTGGAC CCTCACGCAG GACCCTAGGA GCCCCGGACA 6550

TTTCTCTCAGG AACATCAGAC ACAGGCTCCC TGCCACCCAA CCTCCAGCCT 6600

GGATATTCTC CTTCCCCAAC CCATCCTCCT ACTGGACAGT ATACGCTCTT 6650

20 CCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCCTGT GGTCCAGCTC CACCCCTGC 6700

TTCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC 6750

25 ACATCCTACA CCCACTCCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AAGGTTCTCA 6800

GAACTGCCC ACATCAGCAT TGTCTCATGT ACAGCTCCCT TCCCTGCAGG 6850

GCGCCCCTGG GAGACAACTG GACAAGATTT CCTACTTTCT CCTGAAACCC 6900

30 AAAGCCCTGG TAAAAGGGAT ACACAGGACT GAAAAGGGAA TCATTTTCA 6950

CTGTACATTA TAAACCTTCA GAAGCTATTT TTTAAGCTA TCAGCAATAC 7000

TCATCAGAGC AGCTAGCTCT TTGGTCTATT TTCTGCAGAA ATTTGCAACT 7050

35 CACTGATTCT CTACATGCTC TTTTCTGTG ATAACCTCTG AAAGGCCTGG 7100

GCTGGCCTGG CAGTTGAACA GAGGGAGAGA CTAACCTTGA GTCAGAAAAC 7150

AGAGAAAGGG TAATTTCTTT TGCTTCAAAT TCAAGGCCTT CCAACGCCCC 7200
CATCCCCTTT ACTATCATTC TCAGTGGGAC TCTGATCCCA TATTCTTAAC 7250
5 AGATCTTTAC TCTTGAGAAA TGAATAAGCT TTCTCTCAGA AATGCTGTCC 7300
CTATACACTA GACAAAACCTG AGCCTGTATA AGGAATAAAT GGGAGCGCCG 7350
AAAAGCTCCC TAAAAAGCAA GGGAAAGATG TTCTTCGAGG GTGGCAATAG 7400
10 ATCCCCCTCA CCCTGCCACC CCAAACAAAA AAGCTAACAG GAAGCCTTGG 7450
AGAGCCTCAC ACCCCAGGTA AGGCTGTGTA GACAGTTCAG TAAAGACAGG 7500
15 ACCTGGATGT GACAGCTGAG CAAACAGCTA GAGCTTTGGC AGCTCAGCAG 7550
GAGGCTTTGC CAGGCATGGA CGCCTGCCTC CCTCCTGTGG AGGTCAGGAG 7600
GAAGTGCAGG AAGTGGCATG AGTCAGGCTC CTTGAGCTCA CACAGCAGGA 7650
20 GAACAAGTAC AAGTCAAGTA CAAGTTGAAG GCTCATTTCC CAGTTCCCGC 7700
AAATGCATCT AAAAAGCAGC TCTGTGTGAC CACCATAAAC TCTGCTAGGG 7750
GATCTCTAAA AAGGAGTCAG GCTTATGGGG CTTTGCAAAT AAGTGCTGCC 7800
25 TTGGTGCTCA GGAAAAGGTT TGTGTTGCAC AAAACACAAA TTCCACTGC 7849

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 12:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 1443 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 12:

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50
5 AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAAGG GAGAGGCCCC 100
ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGAATG GAGCTGACTG 150
ATTTGCTCCT GCGCGCCATG CTTCTTGCA GGGCAAGACT AACTCTGTCC 200
10 AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCCA GCTCCTAAATA AACTGCTGCG 250
TGACTCCAC CTCCTTCACA GCGACTGAG TCAGTGTCCT GACGTCGACC 300
CTTTGTCTAT CCCTGTTCTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA 350
15 TGGAAAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT 400
GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCCT 450
20 CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC 500
TTGGGGGCCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA 550
CAAGGACCCC AATGCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAACCTG CTTGGGGGAA 600
25 AGGTGCGCTT CCTGCTTCTG GTAGAAGGTC CCACCCTCTG TGTCAGACGG 650
ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT 700
AAACAAGTTC CCAAACAGGA CTTCTGGATT GTTGGAGACG AACTTCAGTG 750
30 TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTC 800
AGAGTCAAGA TTA CTCTGG TCAGCTAAAT CAAACCTCCA GGTCCCCAGT 850
35 CCAAATCTCT GGATACCTGA ACAGGACACA CGACCTGTG AATGGAACCT 900
ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACTTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC 950

TCGCCCCGAG CTTTCAACAA AGGCTCCCTG GCATTCAACC TCCAGGGTGG 1000

ACTTCCTCCT TCTCCAAGCC TTGCTCCTGA TGGACACACA CCCTTCCCTC 1050

5 CTTACACCGC CTTGCCCACC ACCCATGGAT CTCCACCCCA GCTCCACCCC 1100

CTGTTTCCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AACTCTACCG CCCCTCATCC 1150

AGTCACAATG TACCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG 1200

10 GGCCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC 1250

AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT 1300

AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG 1350

15 GAGCTATTTT TTTTAACTT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA 1400

TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTGAA AATCACTAAT TCT 1443

20

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 13:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 352 aminosyrer
- 25 (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 13:

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

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

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

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val
50 55 60

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
65 70 75

5

10

15

20

25

30

31

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 14:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 1536 baser

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 14:

10

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50

AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAGGG GAGAGGCCCC 100

15

ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGAATG GAGCTGACTG 150

ATTTGCTCCT GCGGCCCATG CTTCTTGCA GGGCAAGACT AACTCTGTCC 200

AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCCAAG CTCCTAAATA AACTGCTGCG 250

20

TGACTCCAC CTCCTTCACA GCCGACTGAG TCAGTGTCCT GACGTCGACC 300

CTTTGTCTAT CCCTGTTCTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA 350

TGGAAAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT 400

25

GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCTT 450

CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC 500

TTGGGGGCCC TGACGGGCCT CTAGGAACC CAGCTTCCTC TACAGGGCAG 550

30

GACCACAGCT CACAAGGACC CCAATGCCCT CTTCTTGAGC TTGCAACAAC 600

TGCTTCGGGG AAAGGTGCGC TTCCTGCTTC TGGTAGAAGG TCCCACCTC 650

35

TGTGTCAGAC GGACCCTGCC AACCACAGCT GTCCCAAGCA GTACTTCTCA 700

ACTCCTCACA CTAAACAAGT TCCCAAACAG GACTTCTGGA TTGTTGGAGA 750

CGAACTTCAG TGTCACAGCC AGAACTGCTG GCCCTGGACT TCTGAGCAGG 800
CTTCAGGGAT TCAGAGTCAA GATTACTCCT GGTCAGCTAA ATCAAACCTC 850
5 CAGGTCCCCA GTCCAAATCT CTGGATACCT GAACAGGACA CACGGACCTG 900
TGAATGGAAC TCATGGGCTC TTTGCTGGAA CCTCACTTCA GACCCTGGAA 950
GCCTCAGACA TCTCGCCCGG AGCTTTCAAC AAAGGCTCCC TGGCATTCAA 1000
10 CCTCCAGGGT GGACTTCCTC CTTCTCCAAG CTTTGCTCCT GATGGACACA 1050
CACCTTCCC TCCTTCACCT GCCTTGCCCA CCACCCATGG ATCTCCACCC 1100
15 CAGCTCCACC CCCTGTTTCC TGACCCTTCC ACCACCATGC CTAACCTAC 1150
CGCCCTCAT CCAGTCACAA TGTACCCTCA TCCCAGGAAT TTGTCTCAGG 1200
AAACATAGCG CGGGCACTGG CCCAGTGAGC GTCTGCAGCT TCTCTCGGGG 1250
20 ACAAGCTTCC CCAGGAAGGC TGAGAGGCAG CTGCATCTGC TCCAGATGTT 1300
CTGCTTTCAC CTAAGAGGCC CTGGGAAGG GATACACAGC ACTGGAGATT 1350
GTAAATTTT AGGAGCTATT TTTTTTTAAC CTATCAGCAA TATTCATCAG 1400
25 AGCAGCTAGC GATCTTTGGT CTATTTTCGG TATAAATTG AAAATCACTA 1450
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1500
30 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1536

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 15:

35

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 356 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 15:

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

Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ala
 290 295 300
 Pro Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr
 305 310 315
 5 Thr His Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro
 320 325 330
 Ser Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met
 335 340 345
 Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr
 350 355 356

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 16:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 15 (A) LENGDE: 241 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: linear

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 16:

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

Ser Gln Asn Cys Trp Pro Trp Thr Ser Glu Gln Ala Ser Gly Ile
155 160 165

Gln Ser Gln Asp Tyr Ser Trp Ser Ala Lys Ser Asn Leu Gln Val
170 175 180

5

Pro Ser Pro Asn Leu Trp Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Cys
185 190 195

Glu Trp Asn Ser Trp Ala Leu Cys Trp Asn Leu Thr Ser Asp Pro
200 205 210

10

Gly Ser Leu Arg His Leu Ala Arg Ser Phe Gln Gln Arg Leu Pro
215 220 225

Gly Ile Gln Pro Pro Gly Trp Thr Ser Ser Phe Ser Lys Pro Cys
230 235 240

Ser
241

15 (2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 17:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 335 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

20

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 17:

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

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

Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp
35 40 45

30 Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys Ala
50 55 60

Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys Leu Ser Ser Leu Leu
80 85 90

35 Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
95 100 105

Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala
110 115 120

His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu
125 130 135

Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu
 140 145 150
 Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr
 155 160 165
 5 Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly
 170 175 180
 Leu Leu Glu Thr Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala Gly Pro
 185 190 195
 Gly Leu Leu Ser Arg Leu Gln Gly Phe Arg Val Lys Ile Thr Pro
 10 200 205 210
 Gly Gln Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile Ser Gly
 215 220 225
 Tyr Leu Asn Arg Thr His Gly Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu
 230 235 240
 15 Phe Ala Gly Thr Ser Leu Gln Thr Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser
 245 250 255
 Pro Gly Ala Phe Asn Lys Gly Ser Leu Ala Phe Asn Leu Gln Gly
 260 265 270
 Gly Leu Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ala Pro Asp Gly His Thr Pro
 275 280 285
 20 Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr Thr His Gly Ser Pro Pro
 290 295 300
 Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro Ser Thr Thr Met Pro Asn
 305 310 315
 Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met Tyr Pro His Pro Arg Asn
 320 325 330
 25 Leu Ser Gln Glu Thr
 335

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 18:

30

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 332 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 18:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15
 Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Gly Arg Leu Ser Gln Cys Pro
 20 25 30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 19:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 1026 baser

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 19:

10

AGCCCGGCTC CTCCTGCCTG TGACCCCGA CTCCTAAATA AACTGCTTCG 50

TGACTCCCAT GTCCTTCACG GCAGACTGAG CCAGTGCCCA GACATTAACC 100

15 CTTTGTCAC ACCTGTCCTG CTGCCTGCTG TGGACTTCAC CTTGGGAGAA 150

TGGAAAACCC AGACGGAGCA GACAAAGGCA CAGGATGTCC TGGGAGCCAC 200

AACCCTTCTG CTGGAGGCAG TGATGACAGC ACGGGGACAA GTGGGACCCC 250

20

CTTGCTCTC ATCCCTGCTG GTGCAGCTTT CTGGACAGGT TCGCCTCCTC 300

CTCGGGGCCC TGCAGGACCT CCTTGGAATG CAGCTTCCTC CACAGGGAAG 350

GACCACAGCT CACAAGGATC CCAGTGCCAT CTTCTGAAC TTCCAACAAC 400

25

TGCTCCGAGG AAAGGTGCGT TTCCTGCTCC TTGTAGTGGG GCCCTCCCTC 450

TGTGCCAAGA GGGCCCACCC CGCCATAGCT GTCCCGAGCA GCACCTCTCC 500

30

ATTCCACACA CTGAACAAGC TCCCAAACAG GACCTCTGGA TTGTTGGAGA 550

CAAACCTCAG TATCTCAGCC AGAACTACTG GCTCTGGATT TCTCAAGAGG 600

CTGCAGGCAT TCAGAGCCAA GATTCCTGGT CTGCTGAACC AAACCTCCAG 650

35

GTCCCTAGAC CAAATCCCTG GACACCAGAA TGGGACACAC GGACCCTTGA 700

GTGGAATTCA TGGACTCTTT CCTGGACCCC AACCCGGGGC CCTCGGAGCT 750

CCAGACATTC CTCCAGCAAC TTCAGGCATG GGCTCCCGGC CAACCTACCT 800

CCAGCCTGGA GAGTCTCCTT CCCGAGCTCA CCCTTCTCCT GGACGATACA 850

CTCTCTTCTC TCCTTCACCC ACCTCGCCCT CCCCCACAGT CCAGCTCCAG 900

5 CCTCTGCTTC CTGACCCCTC TGCATCACA CCCAACTCTA CCAGTCCTCT 950

TCTATTTGCA GCTCACCTC ATTTCCAGAA CCTGTCTCAG GAAGAGTAAG 1000

GTGCTCAGAC CCTGCCAACT TCAGCA 1026

10

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 20:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

15

(A) LENGDE: 1014 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 20:

AGCCCGGCTC CTCCTGCCTG TGACCCCGA CTCCTAAATA AACTGCTTCG 50

TGACTCCCAT GTCCTTCACG GCAGACTGAG CCAGTGCCCA GACATTAACC 100

25

CTTTGTCCAC ACCTGTCCTG CTGCCTGCTG TGGACTTCAC CTTGGGAGAA 150

TGGAAAACCC AGACGGAGCA GACAAAGGCA CAGGATGTCC TGGGAGCCAC 200

30

AACCCCTTCTG CTGGAGGCAG TGATGACAGC ACGGGGACAA GTGGGACCCC 250

CTTGCCTCTC ATCCCTGCTG GTGCAGCTTT CTGGACAGGT TCGCCTCCTC 300

CTCGGGGCCC TGCAGGACCT CCTTGAATG CAGGGAAGGA CCACAGCTCA 350

35

CAAGGATCCC AGTGCCATCT TCCTGAACTT CCAACAACCTG CTCCGAGGAA 400

AGGTGCGTTT CCTGCTCCTT GTAGTGGGGC CCTCCCTCTG TGCCAAGAGG 450

GCCCCACCCG CCATAGCTGT CCCGAGCAGC ACCTCTCCAT TCCACACACT 500

GAACAAGCTC CCAAACAGGA CCTCTGGATT GTTGGAGACA AACTCCAGTA 550
 TCTCAGCCAG AACTACTGGC TCTGGATTTC TCAAGAGGCT GCAGGCATTG 600
 5 AGAGCCAAGA TTCCTGGTCT GCTGAACCAA ACCTCCAGGT CCCTAGACCA 650
 AATCCCTGGA CACCAGAATG GGACACACGG ACCCTTGAGT GGAATTCATG 700
 GACTCTTTCC TGGACCCCAA CCCGGGGCCC TCGGAGCTCC AGACATTCCT 750
 10 CCAGCAACTT CAGGCATGGG CTCCCGGCCA ACCTACCTCC AGCCTGGAGA 800
 GTCTCCTTCC CCAGCTCACC CTCTCCTGG ACGATACTCT CTCTTCTCTC 850
 15 CTTCACCCAC CTCGCCCTCC CCCACAGTCC AGCTCCAGCC TCTGCTTCCT 900
 GACCCCTCTG CGATCACACC CAACTCTACC AGTCCTCTTC TATTTGCAGC 950
 TCACCCTCAT TTCCAGAACC TGTCTCAGGA AGAGTAAGGT GCTCAGACCC 1000
 20 TGCCAACTTC AGCA 1014

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 21:

25

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 328 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 21:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu
1				5					10					15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro
35				20				25						30
Asp	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp
				35				40						45

	Phe	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Ala	
					50					55					60	
	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Met	
					65					70					75	
5	Thr	Ala	Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Pro	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	
					80					85					90	
	Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	
					95					100					105	
10	Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	
					110					115					120	
	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	
					125					130					135	
	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu	Cys	Ala	Lys	Arg	
					140					145					150	
15	Ala	Pro	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Phe	His	
					155					160					165	
	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	
					170					175					180	
	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Phe	Leu	Lys	
					185					190					195	
20	Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	
					200					205					210	
	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	His	Gln	Asn	Gly	Thr	
					215					220					225	
25	His	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Ile	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	
					230					235					240	
	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	
					245					250					255	
	Met	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Leu	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	Ser	
					260					265					270	
30	Pro	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Gly	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	
					275					280					285	
	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Val	Gln	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro	
					290					295					300	
	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Phe	
					305					310					315	
35	Ala	Ala	His	Pro	His	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Glu			
					320					325			328			

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 22:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 5141 baser

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 22:

10

TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG 50

GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA 100

15

GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG 150

TCCCCAGGCT CCCGAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA 200

GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC 250

20

CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTTTTATT 300

TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG 350

AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG 400

25

CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA 450

GTACCGCCTA TAGAGCGATA AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT 500

30

TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAATATG GGGATTGGCA 550

AGAACGGAGA CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC 600

CAAAGAATGA CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAACAGA ATCTGGTGAT 650

35

TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC TGAGAAGAAT CGACCTTTAA 700

AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA 750

GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA 800
ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA 850
5 GTTCTGTTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT 900
GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT 950
TGATTTGGGG AAATATAAAC CTCTCCCAGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG 1000
10 AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG 1050
AAAGACTAAC AGGAAGATGC TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT 1100
15 ATGCATTTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG 1150
CTTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATACAC 1200
ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA 1250
20 CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG 1300
GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC 1350
AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC 1400
25 AAATTCACA AATAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT 1450
CCAAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT 1500
CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGTTAG 1550
30 GTACCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG 1600
TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA 1650
35 TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG 1700
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG 1750

CCCCTAACTC CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCCAGTT CCGCCCATTC 1800
 TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTPTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG 1850
 5 CCTCGGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC 1900
 CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG 1950
 10 CGCCATTTAA ATCCTGCAGG TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTACA 2000
 ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGEGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGAG 2050
 CACATCCCCC CTTCCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT 2100
 15 CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GCGGAATGGC GCCTGATGCG 2150
 GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAA 2200
 GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG 2250
 20 TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT 2300
 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCG 2350
 TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC 2400
 25 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG 2450
 CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTGG AGTCCACGTT 2500
 30 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAACTGG AACAACACTC AACCTATCT 2550
 CGGGCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTC GGCCTATTGG 2600
 TTAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT 2650
 35 ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG 2700
 CCGCATAGTT AAGCCAACTC CGCTATCGCT ACGTGACTGG GTCATGGCTG 2750
 CGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGCTCTG 2800

CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT 2850
GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCTT 2900
5 GAAGACGAAA GGGCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG 2950
ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG 3000
CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC 3050
10 TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG 3100
AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCCT TTTTTCGGGC 3150
15 ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG 3200
ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC 3250
AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT 3300
20 GATGAGCACT TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGATG 3350
ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTGCGCGCA TACACTATTC TCAGAAATGAC 3400
TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC 3450
25 AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG 3500
CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT 3550
TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA 3600
30 GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG 3650
CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA 3700
35 GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG 3750
ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT 3800
CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA 3850

GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC 3900
AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA 3950
5 TTAAGCATTG GTAAGTGTCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT 4000
GATTTAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT 4050
TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG 4100
10 CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT 4150
CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT 4200
15 GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAAGT 4250
GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG 4300
TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT 4350
20 GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA 4400
CCGGGTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC 4450
TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC 4500
25 CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG 4550
AAGGGAGAAA GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA 4600
GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 4650
30 TGTGCGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT 4700
CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG 4750
35 TTCTGGCCT TTTGCTGGC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC 4800
CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG 4850

CTCGCCGCGAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG 4900

GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGCGTT GGCCGATTCA 4950

5

TTAATCCAGC TGGCAGGACA GGTTCCTCGA CTGGAAAGCG GGCAGTGAGC 5000

GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA 5050

10

CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 5100

ATTCACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGAATTA A 5141

15 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 23:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

20

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 23:

25 ATGTCNCCNG CNCCNCCNGC N 21

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 24:

30

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 24:

ATGTCTCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 25:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LENGDE: 21 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 25:

10

ATGTCGCCTG CTCCACCTGC T 21

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 26:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 20 (A) LENGDE: 21 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 26:

ATGTCGCCAG CGCCACCAGC C 21

25

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 27:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 30 (A) LENGDE: 21 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 27:

ATGTCCCCAG CCCCACCCGC A 21

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 28:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 21 baser
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅD: enkelttrådet
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 28:

ATGTCGCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 29:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 25 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 29:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu
1				5					10					15
Leu	Arg	Asp	Asp	His	Val	Leu	His	Gly	Arg					
				20				25						

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 30:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 30:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15
 5 Leu Arg Asp Asp Xaa Val Leu His Gly Arg Leu
 20 25 26

10 (2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 31:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 25 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 15 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 31:

20 Ser Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15
 Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg
 20 25

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 32:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 14 aminosyrer
 30 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 32:

35 Xaa Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Xaa Asn Lys
 1 5 10 14

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 33:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 9 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 33:

10 Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg
1 5 9

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 34:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 45 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

20 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 34:

GCCGTGAAGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCG 45

25

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 35:

30 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 20 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 35:

CCNGCNCCNC CNGCNTGYGA 20

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 36:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 21 baser
- 5 (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 36:

10

NCCRTGNARN ACRTGRTCRT C 21

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 37:

15

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 69 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- 20 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 37:

25

CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA 50

TGACCACGTT CAGCACGGC 69

30 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 38:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 69 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- 35 (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 38:

GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGGAGCACT 50

5 ACTGGTGCAA GTCGTGCCG 69

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 39:

10

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 69 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

15 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 39:

CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50

20

CGACCACGTC CATCACGGC 69

25 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 40:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 69 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

30 (C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 40:

35 GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGAAGCACT 50

GCTGGTGCA GTAGTGCCG 69

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 41:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LENGDE: 69 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 41:

10

CCAGCACCGC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50

CGATCATGTC TATCACGGT 69

15

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 42:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 20 (A) LENGDE: 69 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

25 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 42:

GGTCGTGGCG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGAAGCACT 50

GCTAGTACAG ATAGTGCCA 69

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 43:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 37 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 43:

GCTAGCTCTA GAAATTGCTC CTCGTGGTCA TGCTTCT 37

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 44:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 22 baser

10 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 44:

15

CAGTCTGCCG TGAAGGACAT GG 22

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 45:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

25 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 45:

TGTGGACTTT AGCTTGGGAG AATG 24

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 46:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 22 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 46:

GGTCCAGGGA CCTGGAGGTT TG 22

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 47:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 31 baser

10

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 47:

15

ATCGATATCG ATAGCCAGAC ACCCCGGCCA G 31

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 48:

20

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 36 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

25

(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 48:

GCTAGCTCTA GACAGGGAAG GGAGCTGTAC ATGAGA 36

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 49:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35

(A) LENGDE: 24 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 49:

CTCCTTGGAA CCCAGGGCAG GACC 24

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 50:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 baser

10

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 50:

15

GGTCCTGCCC TGGGTTCCAA GGAG 24

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 51:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 27 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

25

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 51:

CTGCTCCGAG GAAAGGACTT CTGGATT 27

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 52:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35

(A) LENGDE: 27 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 52:

AATCCAGAAG TCCTTTCCTC GGAGCAG 27

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 53:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 28 baser

10 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 53:

15

CCCTCTGCGT CGCGGCGGCC CCACCCAC 28

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 54:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 28 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

25 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 54:

GTGGGTGGGG CCGCCGCGAC GCAGAGGG 28

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 55:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 35 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 55:

GACTCGAGGA TCCATCGATT TTTTTTTTTT TTTT 35

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 56:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 17 baser

10

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 56:

15

GACTCGAGGA TCCATCG 17

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 57:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 32 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

25

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 57:

GCTAGCTCTA GAAGCCCGGC TCCTCCTGCC TG 32

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 58:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35

(A) LENGDE: 21 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 58:

CGAAATTAAC CCTCACTAAA G 21

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 59:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 103 baser

10

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 59:

15

TGCAGCAAGG GCTACTGCCA CACTCGAGCT GCGCAGATGC TAGCCTCAAG 50

ATGGCTGATC CAAATCGATT CCGCGGCAAA GATCTTCCGG TCCTGTAGAA 100

20

GCT 103

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 60:

25

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 103 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 60:

AGCTTCTACA GGACCGGAAG ATCTTGCCG CGGAATCGAT TTGGATCAGC 50

CATCTTGAGG CTAGCATCTG CGCAGCTCGA GTGTGGCAGT AGCCCTTGCT 100

35

GCA 103

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 61:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 18 baser
- 5 (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 61:

10

TCTCGCTACC GTTTACAG 18

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 62:

15

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 25 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- 20 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 62:

25

CAGGTACCCA CCAGGCGGTC TCGGT 25

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 63:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 30 (A) LENGDE: 18 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

35 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 63:

GGGCCATGAC ACTGTCAA 18

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 64:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 40 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 64:

GACCGCCACC GAGACCGCCT GGTGGGTACC TGTGGTCCTT 40

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 65:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 32 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 65:

ATCGATATCG ATCAGCCAGA CACCCCGGC AG 32

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 66:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 35 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 66:

TCTAGATCTA GATCACCTGA CGCAGAGGGT GGACC 35

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 67:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LENGDE: 33 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 67:

10

AGTCGACGTC GACGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC 33

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 68:

15

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 20 (A) LENGDE: 36 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 68:

25

AGTCGACGTC GACTCACCTG ACGCAGAGGG TGGACC 36

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 69:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

30

- (A) LENGDE: 62 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

35

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 69:

CGCGTATGCC AGCCCGGCTC CTCCTGCTTG TGACCTCCGA GTCCTCAGTA 50

AACTGCTTCG TG 62

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 70:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 61 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 70:

ATACGGTCGG GCCGAGGAGG ACGAACACTG GAGGCTCAGG AGTCATTGA 50
CGAAGCACTG A 61

15 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 71:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 37 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 71:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC TTCTTAA 37

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 72:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 37 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 72:

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGAAGA ATTGCGC 37

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 73:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 69 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 73:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT ATCACCATCA CCATCACCAT 50
CACATCGAAG GTCGTAGCC 69

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 74:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 62 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 74:

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGTAGT GGTAGTGGTA GTGGTAGTGT 50
AGCTTCCAGC AT 62

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 75:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 69 baser
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: enkelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 75:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50

5 CACATCGAAC CACGTAGCC 69

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 76:

10

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 62 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

15

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 76:

20

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGTAGT GGTAGTGGTA GTGGTAGTGT 50

AGCTTGGTGC AT 62

25 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 77:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 19 baser

(B) TYPE: nukleinsyre

30

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 77:

35 TCCACCCTCT GCGTCAGGT 19

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 78:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 18 baser
- 5 (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 78:

10

GGAGACGCAG TCCATCGA 18

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 79:

15

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 62 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- 20 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 79:

25

GCAGCAGTTC TAGAATTATG TCNCCNGCNC CNCCNGCNTG TGACCTCCGA 50

GTTCTCAGTA AA 62

30 (2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 80:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 49 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- 35 (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 80:

ACACTGGAGG CTCAAGAGTC ATTTGACGAA GCACTGAGGG TACAGGAAG 49

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 81:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 45 baser
- 10 (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 81:

15

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTA TCGAAGGTCG TAGCC 45

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 82:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 38 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- 25 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 82:

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAATAGCT TCCAGCAT 38

30

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 83:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 45 baser
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: enkelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 83:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC TTCTTAAACG TAGCC 45

5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR. 84:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 38 baser

10 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: enkelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 84:

15

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGAAGA ATTTGCAT 38

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 85:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 25 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 85:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Asn	Ala	Tyr	Ala	Ser	Pro
1				5					10				15	

30	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Cys	Val	Arg	Arg	Ala
				20						25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 86:

35

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 31 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 86:

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe His His His His His His His His
 1 5 10 15
 5 Ile Glu Gly Arg Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Cys Val Arg Arg
 20 25 30
 Ala
 31

10

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 87:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 31 aminosyrer
 15 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 87:

20

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe His His His His His His His His
 1 5 10 15
 Ile Glu Pro Arg Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Cys Val Arg Arg
 20 25 30
 Ala
 25 31

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 88:

30

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 7 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 88:

Thr Thr Ala His Lys Asp Pro
 1 5 7

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 89:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 89:

10 His Val Leu His
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 90:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 90:

Ser Arg Leu Ser
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 91:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 91:

35

Ser His Val Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 92:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 92:

10 His Ser Arg Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 93:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 93:

Ala Val Asp Phe
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 94:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 30 (A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 94:

35

Ser Leu Gly Glu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 95:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 95:

10 Ala Val Thr Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 96:

15

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 96:

Leu Leu Glu Gly
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 97:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 97:

35

Leu Ser Ser Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 98:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 98:

10 Leu Gly Gln Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 99:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 5 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 99:

Cys Xaa Leu Ser Ser
1 5

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 100:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 100:

35

Leu Leu Gly Gln
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 101:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 101:

10 Ser Ser Leu Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 102:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 102:

Gly Gln Leu Ser
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 103:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV. ID NR. 103:

35

Cys Leu Ser Ser
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 104:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 104:

10 Leu Gln Ser Leu
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 105:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 105:

Leu Gly Thr Gln
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 106:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 106:

35

Ala Leu Gln Ser
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 107:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 107:

10 Leu Leu Gly Thr
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 108:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 108:

Asn Ala Ile Phe
1 4

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 109:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

30

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 109:

35

Leu Ser Phe Gln
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 110:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 22 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 110:

10 Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu
 1 5 10 15
 Leu Arg Asp Ser His Val Leu
 20 22

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 111:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 24 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 111:

25 His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
 20 24

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 112:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 23 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 112:

Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln
 1 5 10 15
 5 Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
 20 23

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 113:

10

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 21 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

15

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 113:

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
 1 5 10 15
 20 Cys Leu Ser Ser Leu Leu
 20 21

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 114:

25

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 16 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

30

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 114:

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
 1 5 10 15
 35 Ser
 16

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 115:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 22 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 115:

10 Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His
 1 5 10 15
 Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 20 22

15

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 116:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 25 aminosyrer

20 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 116:

25 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg
 20 25

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 117:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

35 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 117:

Met Pro Pro Ala
1 4

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 118:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LENGDE: 5 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 118:

15

Met Ala Pro Pro Ala
1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 119:

20

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 6 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

25

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 119:

Met Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 6

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 120:

(1) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 7 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 120:

Met Ser Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 7

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 121:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

10

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 121:

15

Ala Pro Pro Ala
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 122:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 5 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 122:

Pro Ala Pro Pro Ala
1 5

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 123:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35

(A) LENGDE: 6 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 123:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 6

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 124:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 124:

15

Val Arg Arg Ala
1 4

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 125:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 5 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 125:

Val Arg Arg Ala Pro
1 5

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 126:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 6 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 126:

Val Arg Arg Ala Pro Pro
1 5 6

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 127:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

10 (A) LENGDE: 7 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 127:

15

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
1 5 7

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 128:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 8 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 128:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr
1 5 8

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 129:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 9 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 129:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
1 5 9

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 130:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LENGDE: 10 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 130:

15

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val
1 5 10

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 131:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 11 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 131:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro
1 5 10 11

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 132:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 12 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 132:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser
1 5 10 12

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 133:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

10

(A) LENGDE: 13 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 133:

15

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg
1 5 10 13

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 134:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 134:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr
1 5 10 14

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 135:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 135:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

5

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 136:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

10

(A) LENGDE: 16 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 136:

15

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

Leu
16

20

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 137:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25

(A) LENGDE: 17 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 137:

30

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

Leu Val
17

35

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 138:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

273

(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

5 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 138:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15
Leu Val Leu
18

10

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 139:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

15 (A) LENGDE: 19 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 139:

20

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15
Leu Val Leu Thr
19

25

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 140:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

30 (A) LENGDE: 20 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 140:

35

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15
Leu Val Leu Thr Leu
20

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 141:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 141:

10 Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn
 20 21

15

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 142:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 22 aminosyrer

20 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 142:

25 Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu
 20 22

30

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 143:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 23 aminosyrer

35 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 143:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 5 Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
 20 23

(2) INFORMASJON OM SEKV. ID NR. 144:

10

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

15

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR. 144:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 20 Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro
 20 24

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Isolert *mpl*-ligandpolypeptid,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter
aminosyresekvensen SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL (SEKV. ID. NR.:
30) eller SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR (SEKV. ID. NR.: 31) og er
biologisk aktiv.
- 10 2. Isolert *mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det kodes for av en
nukleinsyre med en sekvens som hybridiserer under middels
strengte betingelser til nukleinsyre med en sekvens som består
av nukleotid 119-196 ifølge fig. 9 (ID NR. 4 eller ID NR. 5).
- 15 3. Fragment av human *mpl*-ligand ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det består av hML(1-
153), hML(7-151), hML(1-191), hML(1-205) eller hML(1-217).
- 20 4. Fragment av en human *mpl*-ligand ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en N-
terminal metionin.
5. Isolert *mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 1,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter
modifiserte kløyvingsseter i aminosyreposisjon R153-R154
og/eller R245-R246 i *mpl*-liganden, som angitt i fig. 14.
6. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 5,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at kløyvingssetet i
aminosyreposisjon R153-R154 er inaktivert ved substitusjon.
7. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at R153-R154 er
35 substituert med Ala-rester.
8. Isolert nukleinsyremolekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for

polypeptidet ifølge ethvert av kravene 1 til 7.

9. Nukleinsyre ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er operativt bundet
5 til en promoter.

10. Isolert nukleinsyre ifølge krav 8 eller 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en sekvens som
hybridiserer under middels strenge betingelser til nukleinsyre
10 med en sekvens fra nukleotidene 119-196 i fig. 9 (SEQ ID NO: 4
eller 5) og som koder for en *mpl*-ligand eller et fragment derav
og har minst én biologisk egenskap fra *mpl*-liganden.

11. Ekspresjonsvektor,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
nukleinsyren ifølge krav 8 eller 10.

12. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med
20 ekspresjonsvektoren ifølge krav 11.

13. Fremgangsmåte for fremstilling av *mpl*-ligand,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter ekspresjon
av nukleinsyren ifølge krav 8 eller 10 i en egnet vertscelle.
25

14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at *mpl*-ligandpolypeptidet
utvinnes fra vertcellen eller vertscelledyrkingsmediet.

30 15. Fremgangsmåte ifølge krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at vertcellen er en CHO-
cellelinje.

16. Antistoff,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at det har evnen til å
binde *mpl*-ligandpolypeptidet ifølge ethvert av kravene 1 til
7.

17. Antistoff ifølge krav 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et monoklonalt
antistoff.
- 5 18. Farmasøytisk preparat for behandling eller
forebyggelse av trombocytopeni,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et *mpl*-
ligandpolypeptid ifølge ethvert av kravene 1 til 7 og en
farmasøytisk akseptabel bærer.
- 10 19. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge ethvert av kravene 1 til
7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er bundet til en
ikke-proteinholdig polymer.
- 15 20. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 19,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polymeren er
polyetylenglykol, polypropylenglykol eller en polyoksyalkylen.
- 20 21. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge ethvert av kravene 1-7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fusjonert til et
heterologt polypeptid.
22. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det heterologe
polypeptid omfatter EPO, G-CSF, IgG eller IL-3.
23. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter
30 aminosyresekvensen som angitt i SEQ ID NO: 85, 86 eller 87.
24. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et
fragment av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) eller
35 fragment av *mpl*-liganden som angitt i SEQ ID NO: 9.
25. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter fragmentet

av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og er kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) omfatter:

5 MPPA, (SEQ ID NO: 117)
 MAPPA, (SEQ ID NO: 118)
 MPAPPA, (SEQ ID NO: 119)
 MSPAPPA, (SEQ ID NO: 120)
 APPA, (SEQ ID NO: 121)
 10 PAPPA, (SEQ ID NO: 122)
 SPAPPA, (SEQ ID NO: 123)
 VRRRA, (SEQ ID NO: 124)
 VRRAP, (SEQ ID NO: 125)
 VRRAPP, (SEQ ID NO: 126)
 15 VRRAPPT, (SEQ ID NO: 127)
 VRRAPPTT, (SEQ ID NO: 128)
 VRRAPPTTA, (SEQ ID NO: 129)
 VRRAPPTTAV, (SEQ ID NO: 130)
 VRRAPPTTAVP, (SEQ ID NO: 131)
 20 VRRAPPTTAVPS, (SEQ ID NO: 132)
 VRRAPPTTAVPSR, (SEQ ID NO: 133)
 VRRAPPTTAVPSRT, (SEQ ID NO: 134)
 VRRAPPTTAVPSRTS, (SEQ ID NO: 135)
 VRRAPPTTAVPSRTSL, (SEQ ID NO: 136)
 25 VRRAPPTTAVPSRTSLV, (SEQ ID NO: 137)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVL, (SEQ ID NO: 138)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 139)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 140)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 141)
 30 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 142)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 143)
 VRRAPPTTAVPSRTSLVLT, (SEQ ID NO: 144),

ett eller flere av restene 176-332 av restene av human ML som er angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og
 35 kombinasjoner derav.

26. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 22,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter fragmentet

av *mpl*-liganden som angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) omfatter:

SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL,
 (SEQ ID NO: 110)
 HSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDF,
 (SEQ ID NO: 111)
 SLGEWKTQMEETKAQDILGAVTL,
 (SEQ ID NO: 112)
 LLEGVMAARGQLGPTCLSSLL,
 (SEQ ID NO: 113)
 GQLSGQVRLLL GALQS,
 (SEQ ID NO: 114)
 LLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIF,
 (SEQ ID NO: 115)
 LSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR, og
 (SEQ ID NO: 116)

og kombinasjoner derav.

27. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21, karakterisert ved at det omfatter fragmentet av *mpl*-liganden som angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og er kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) omfatter minst én av aminosyrene 1, 3-6, 9, 13-15, 17-28, 30, 32-34, 36-41, 43-50, 53-59, 61-68, 71, 73, 75-80, 82-88, 90-96, 98-99, 102-103, 105-107, 110, 112-113, 115-119, 121-130, 132-133, 135, 137-140, 143-150 og 152-156 i SEQ ID NO:1, og kombinasjoner derav.

28. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21, karakterisert ved at det omfatter fragmentet av *mpl*-1-liganden som angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID NO: 1) omfatter minst én av aminosyrene 7-8, 10-12, 16, 29, 31, 35, 42, 51-52, 60, 69, 72, 74, 81, 89, 97, 100-101, 104, 108-109, 111, 114, 120, 131, 134, 136, 141-142 og 151 i SEQ ID NO:1, og kombinasjoner derav.

29. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter fragmentet
av *mpl*-liganden som angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 1) og er
kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ
5 ID NO: 1) omfatter minst én av aminosyrene 111-114, 139-140,
142-144 og 147-150 i SEQ ID NO:1 og kombinasjoner derav.
30. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter fragmentet
10 av *mpl*-liganden ifølge figur 1 (SEQ ID NO: 1) og kjenne-
tegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden i figur 1 (SEQ ID
NO: 1) omfatter aminosyrene kodet av minst ett av exon 1, exon
2, exon 3, exon 4, exon 5 og exon 6 som angitt i figurene 14A,
14B og 14C (SEQ ID NO: 1) og kombinasjoner derav.
- 15 31. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter fragmentet
av *mpl*-liganden som angitt i figur 1 (SEQ ID NO: 9) og
kjennetegnet ved at fragmentet av *mpl*-liganden med SEQ ID NO:
20 9 omfatter minst én av aminosyrene 1-2, 5-8, 10, 12, 13-20,
22-30, 32, 34-35, 38-54, 56, 59-67, 69-81, 83, 85-105, 107-
113, 115-126, 128-130, 132, 134-145, 147, 149 og 151-153 som
angitt i SEQ ID NO:9 og kombinasjoner derav.
- 25 32. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det heterologe poly-
peptid omfatter immonoglobulinkjede eller fragment derav.
33. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 32,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det heterologe
polypeptid omfatter IgG, IgM, IgA, IgD, IgE eller fragment
derav.
34. *Mpl*-ligandpolypeptid ifølge krav 33,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at det heterologe
polypeptid omfatter IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 eller fragment
derav.

1 tcttctaccatctgctccccagagggtgcctgctgcaactgggtcctggagcccttctccacccggatagattcctcaccccttgccccgcctttg
101 cccaccctactctgccccagaagtgaagagcctaagccgcctccatggccccaggaaggattcaggggagagggccccaaacagggagccacgcccagccca
201 gacaccccgccagaATGGAGCTGACTGAATTGCTCTCTCGTGGTCATGCTTCTCTAAGCTCAAGCTTAAGCTGTCTCCAGCCCGGCTCTCTCTGCTTGTG
301 ACCTCCGAGTCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGGCCAGAGGTTACCCCTTTGCCTACACCTGTCTCTGCT
401 GCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAAATGGAAACCCAGATGGAGGACCAAGGCACAGGACATCTCTGGGAGCAGTGACCCCTTCTGTGGAGGGAGTG
501 ATGGCAGCACGGGACAACTGGGACCCACTTGCTCTCATCCCTCCTCTGGGCGAGCTTCTGGACAGGTCCGCTCTCTCTGGGGCCCTGCAGAGCCTCC
601 TTGGAACCCAGCTTCTCCACAGGCGAGGACACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCTTCTCTGGACAGGTCCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTT
701 CCTGATGCTGTAGGAGGTCCACCTCTGCGTCAGGCGGCCCCACCCACACAGCTGTCTCCAGCAACCTCTCTAGTCTCCTCAGCTGAACGAGCTC
801 CCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTTCAGAGCCCAAGA

FIG. 1A

210 ProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGlnLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPhePro
240 TTCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTTGAATGGAACCTCGTGGACTCTTTCC

220 GlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnProGlyTyrSerProSer
260 TGGACCCCTCACGACGAGACCTTAGGAGCCCGGACATTTCTTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCAACCTCCAGCTGGATATTCTCCTTCC

230 ProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSerAla
300 CCAACCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCTGACCCCTTCTG

240 ProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly
330 CTCCAACGCCACCCCTACCGCCCTCTTCTTAACACATCCTACACCCACTCCCAGAACTCTGTCTCAGGAAGGGTAAGgttctcagacactgccgacatc

250 agcattgtctcatgtacagctcccttccctgcaggggccccctgggagacaaactggacaagatttccctactttctcctgaaaccccaagccctggtaaaa

260 gggatacacaggactgaaaagggaatcattttcactgtacattataaaccttcagaaagctattttttaagctatcagcaatactcatcagagcagcta

270 gctcttttggtctattttctgcagaaaatttgcaactcactgattctctacatgctctttttctgtgataactctgcaaaaggcctgggctggcctggcagtt

280 gaacagaggagagactaaccttgagtcagaaaaacagagaaaagggtaatttcccttgccttcaaattcaaggccttccaacgcccccatccccctttactat

290 cattctcagtgaggactctgatcccatattctttaacagatctttactcttgagaaatgaataagctttctctcagaaaaaataaaaaaaaaaaaaaaaaa

FIG. 1B

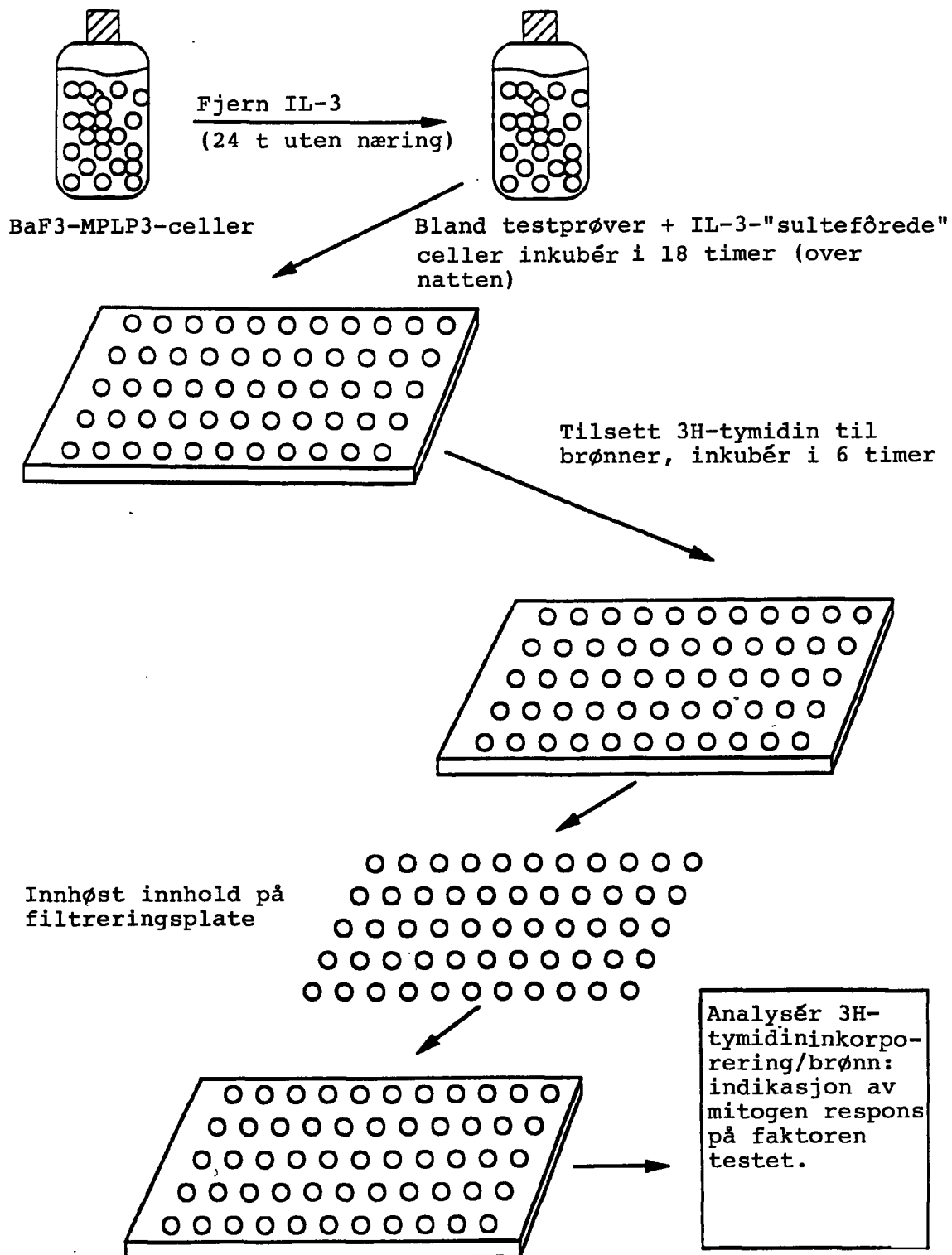


FIG.2

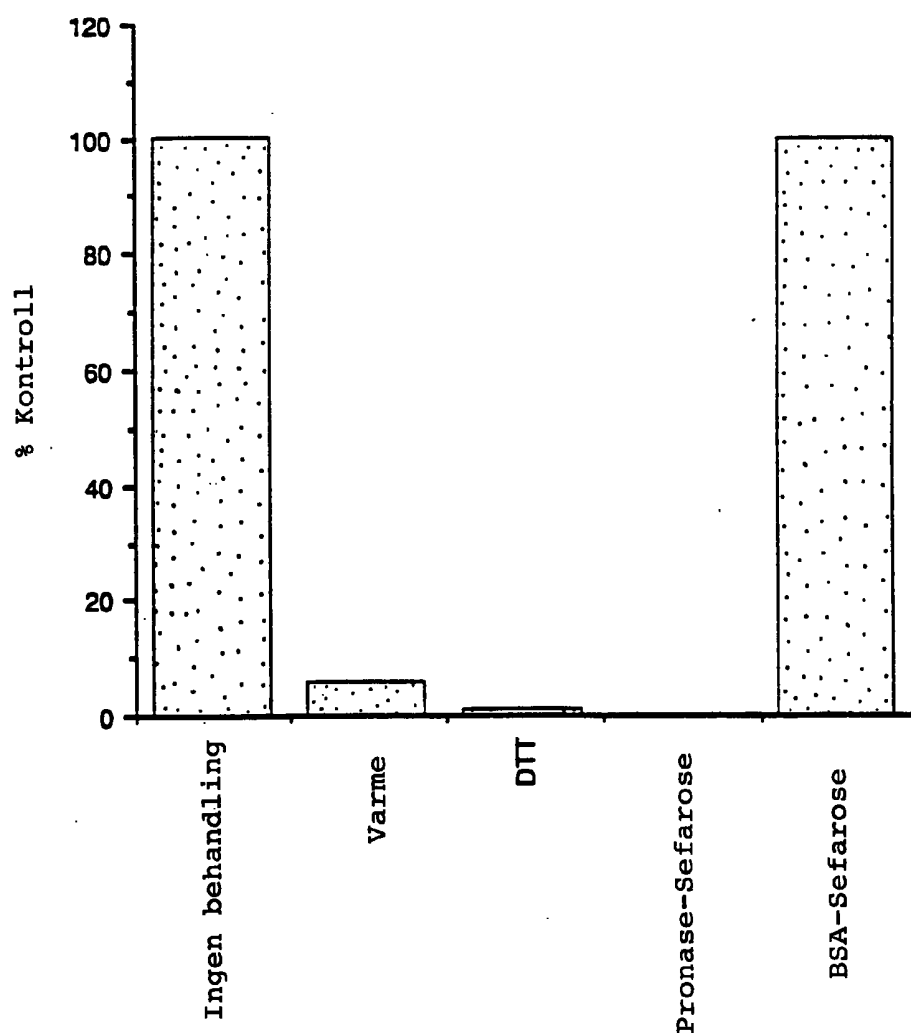


FIG.3

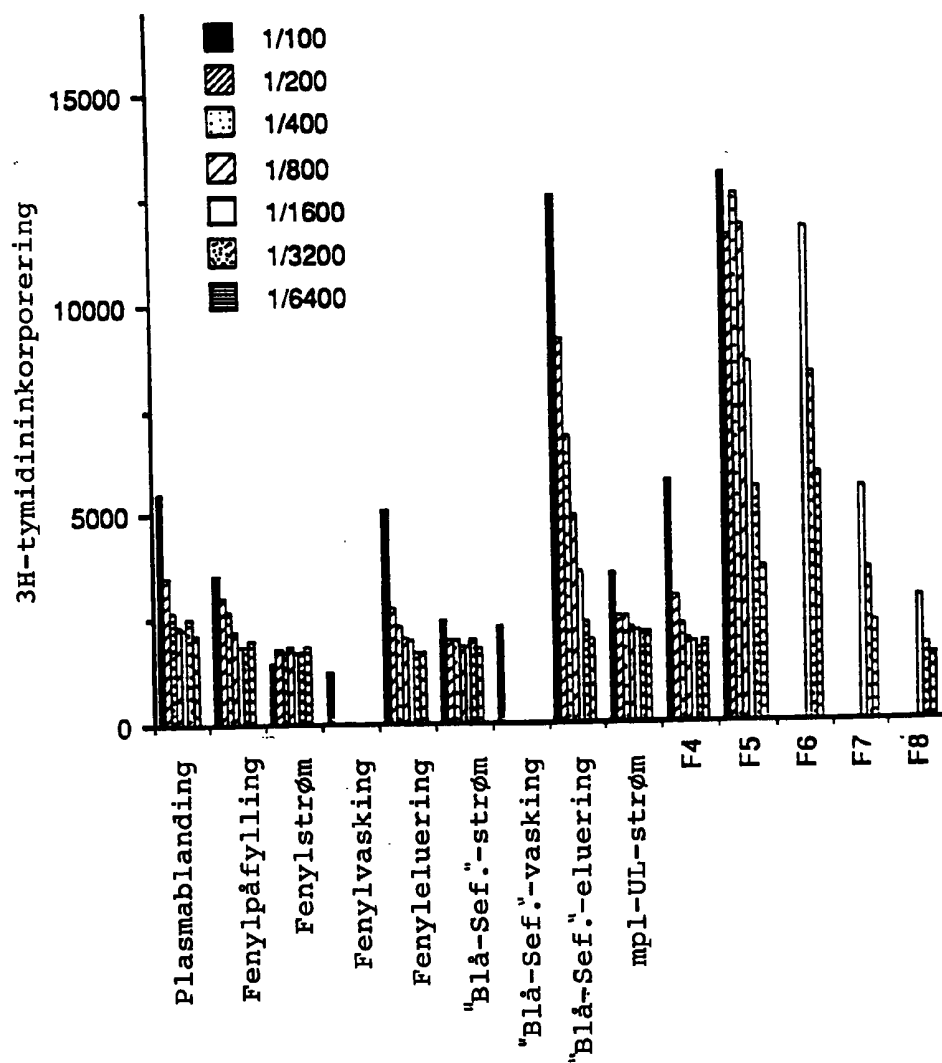


FIG.4

MW x 10⁻³

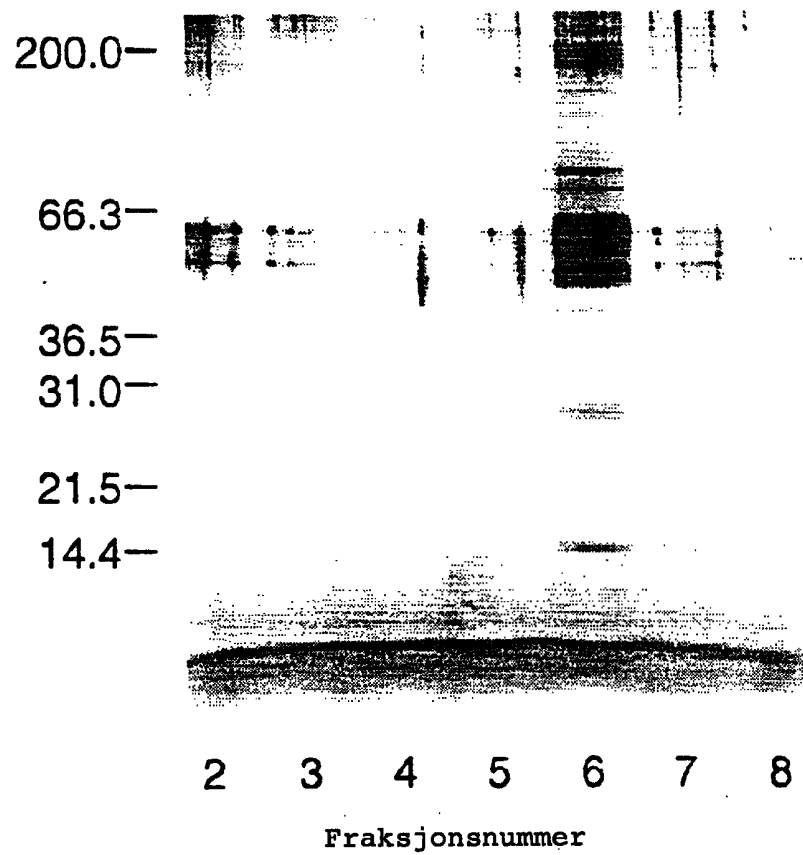


FIG. 5

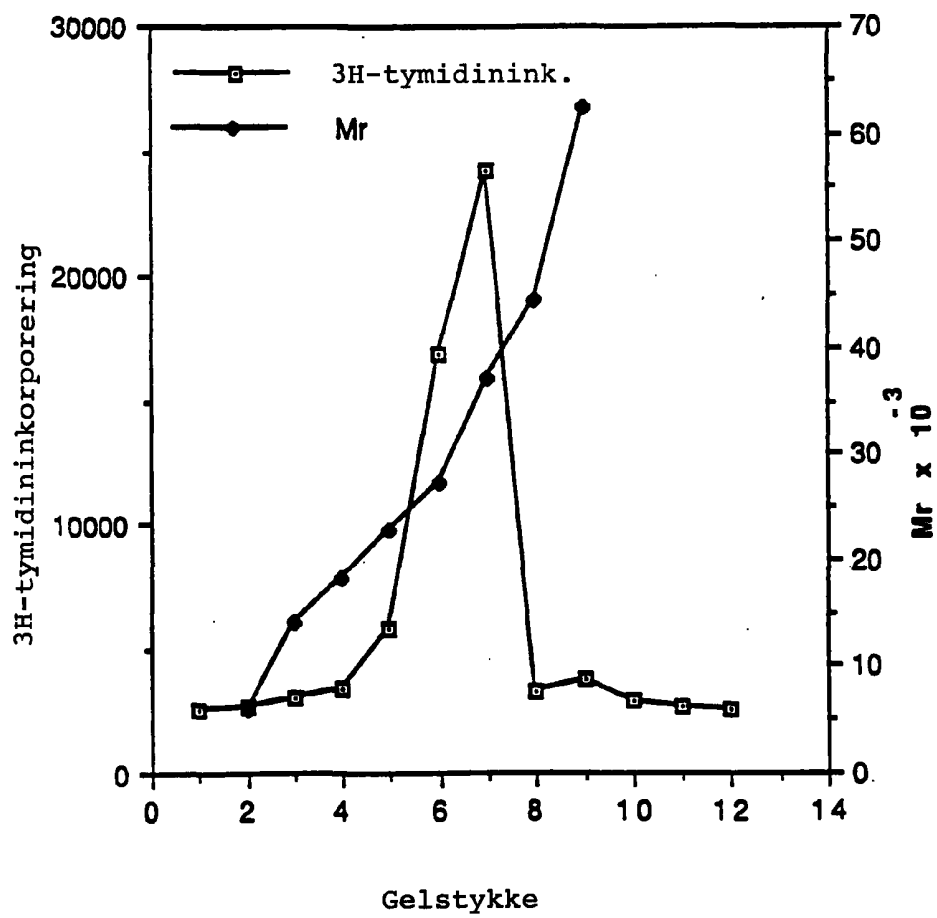


FIG.6

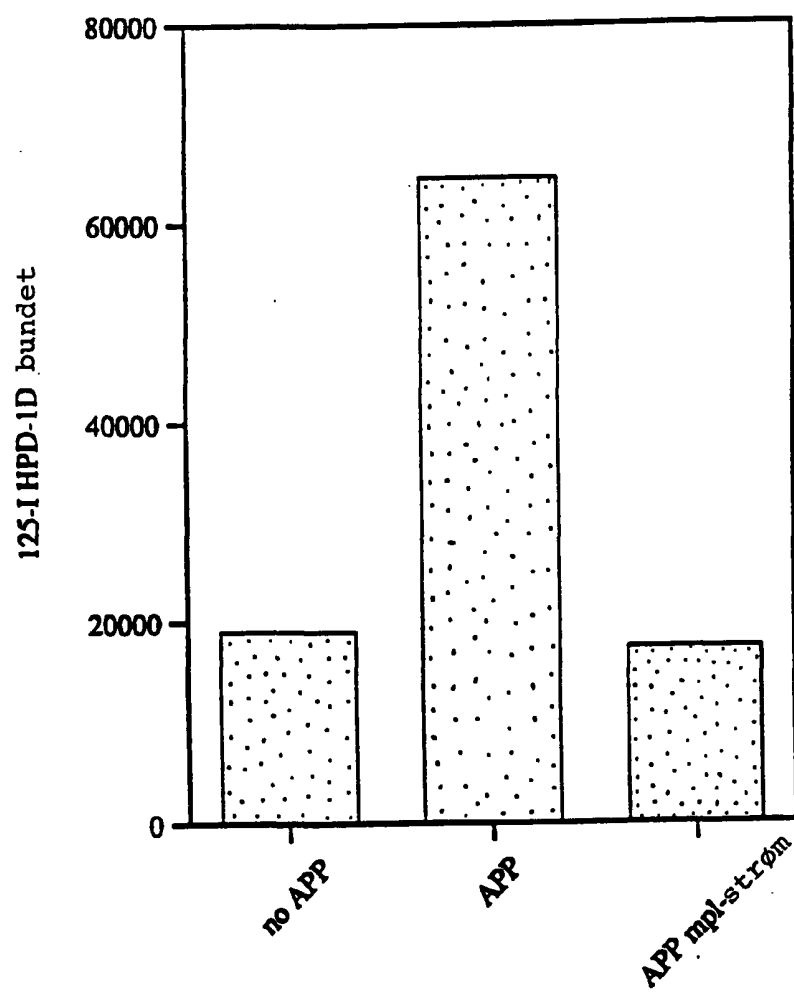


FIG.7

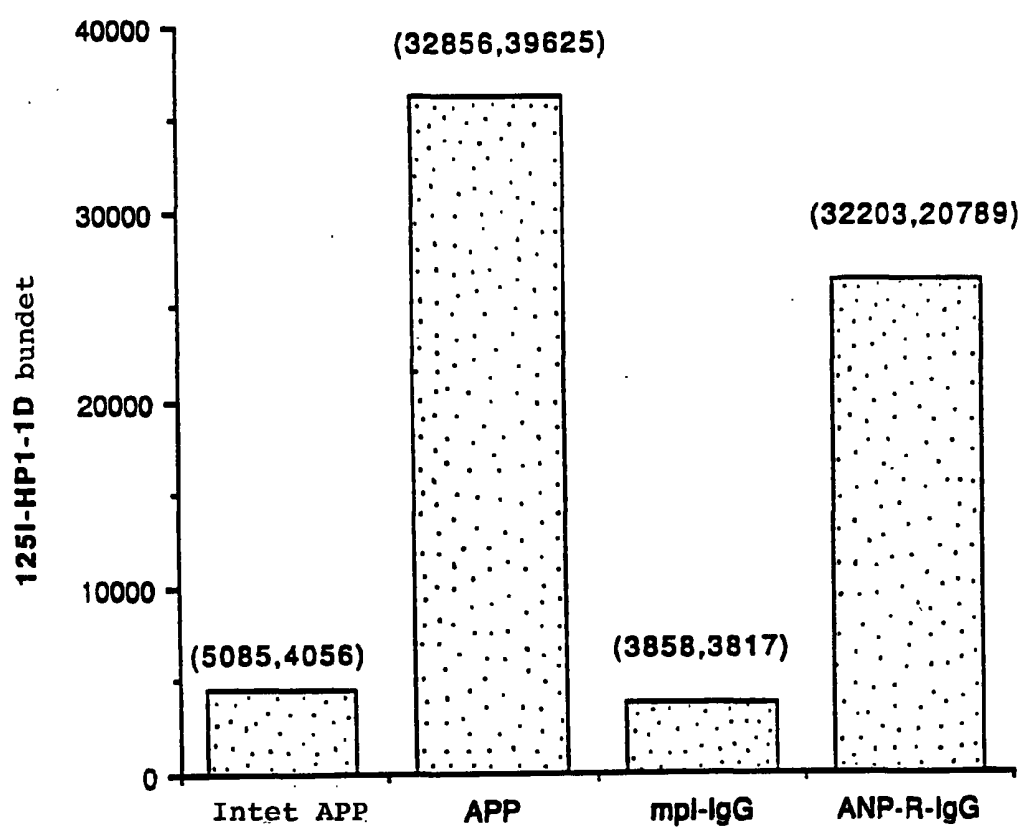


FIG.8

-10
L L L V V M L L L T

1 GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTCAACCT CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT
CTTAAGGACC TTATGGTCGA CTGTTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA

10
A R L T L S S P A P P A C D L R V L S K L L R D S H V L H S R L ↓

101 GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGTG ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGNG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA
CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA GGAGTCAATT GACGAAGCAC TGAGGGGTACA GGAAGTGTCTG TCTGACCACT

20

201 GAACTCCCAA CATTATCCC TTTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA GACACCATCA CTTCTCTTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT
CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AATAGGCGC ATTGACCAAT CTGTGGGTAT GAGGCTCCTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAACCTGG GTTACTGATA

30

301 TCTTCCCATTA TTGTCCCCAC CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAAT ACAGCCCGCA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA
AGAGGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA AGAAGTGTA TGTCGGGCGT AAATTTTCTGA GAGCAGATCT

FIG.9

h-ML	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E		
h-epo	1	A	P	P	R	L	I	C	D	S	R	V	L	E	R	Y	L	L	E	A	K	E	A	E	N	I	T	T	G	C	A	E	H	C	S	L	N	E	N	I	T	V	P	D	T	K	V	N	F	Y	A
h-ML	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	-	-	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	
h-epo	51	W	K	R	M	E	V	G	Q	A	V	E	V	W	Q	G	L	A	L	L	S	E	A	V	L	R	G	Q	A	L	L	V	N	S	S	Q	P	W	E	P	L	Q	L	H	V	D	K	A	V	S	
h-ML	99	L	L	-	-	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	-	-	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L		
h-epo	101	G	L	R	S	L	T	T	L	L	R	A	L	G	A	Q	K	E	A	I	S	P	P	D	A	A	S	A	A	P	L	R	T	I	T	A	D	T	F	R	K	L	L	F	R	V	Y	S	N	F	L
h-ML	143	-	-	M	L	V	G	G	S	T	L	C	V	R	R	A	P	P	T	T	A	V	P	S	R	T	S	L	V	L	T	L	N	E	L	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	F	T	A	S	
h-epo	151	G	K	L	K	L	Y	T	G	E	A	C	R	T	G	D	R																																		
h-ML	191	R	T	T	G	S	G	L	L	K	W	Q	Q	F	R	A	K	I	P	G	L	L	N	O	T	S	R	S	L	D	O	I	P	G	Y	L	N	R	I	H	E	L	L	N	G	T	R	G	L	F	
h-ML	241	P	G	P	S	R	R	T	L	G	A	P	D	I	S	S	G	T	S	D	I	G	S	L	P	P	N	L	Q	P	G	Y	S	P	S	P	T	H	P	P	T	G	Q	Y	T	L	F	P	L	P	
h-ML	291	T	L	P	T	P	V	V	Q	L	H	P	L	L	P	D	P	S	A	P	T	P	T	P	T	S	P	L	L	N	T	S	Y	T	H	S	Q	N	L	S	O	E	G								

FIG.10

hML	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E	
hML2	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E	
hML3	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E	
hML4	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E	
hML	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L	
hML2	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L	
hML3	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L	
hML4	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L	
hML	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	G	S	T	L
hML2	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	G	S	T	L
hML3	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	D	K	L	H
hML4	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	D	K	L	H
hML	151	C	V	R	R	A	P	P	T	T	A	V	P	S	R	T	S	L	V	L	T	L	N	E	L	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	F	T	A	S	A	R	T	T	G	S	G	L	L	K	W
hML2	147	C	V	R	R	A	P	P	T	T	A	V	P	S	R	T	S	L	V	L	T	L	N	E	L	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	F	T	A	S	A	R	T	T	G	S	G	L	L	K	W
hML3	149	C	L	S	Q		N	Y	W	L		W	A	S	E	V	A	A	G	I	Q	S	Q	D	S	W	S	A	E	P	N	L	Q																		
hML4	145	C	L	S	Q		N	Y	W	L		W	A	S	E	V	A	A	G	I	Q	S	Q	D	S	W	S	A	E	P	N	L	Q																		

FIG. 11A

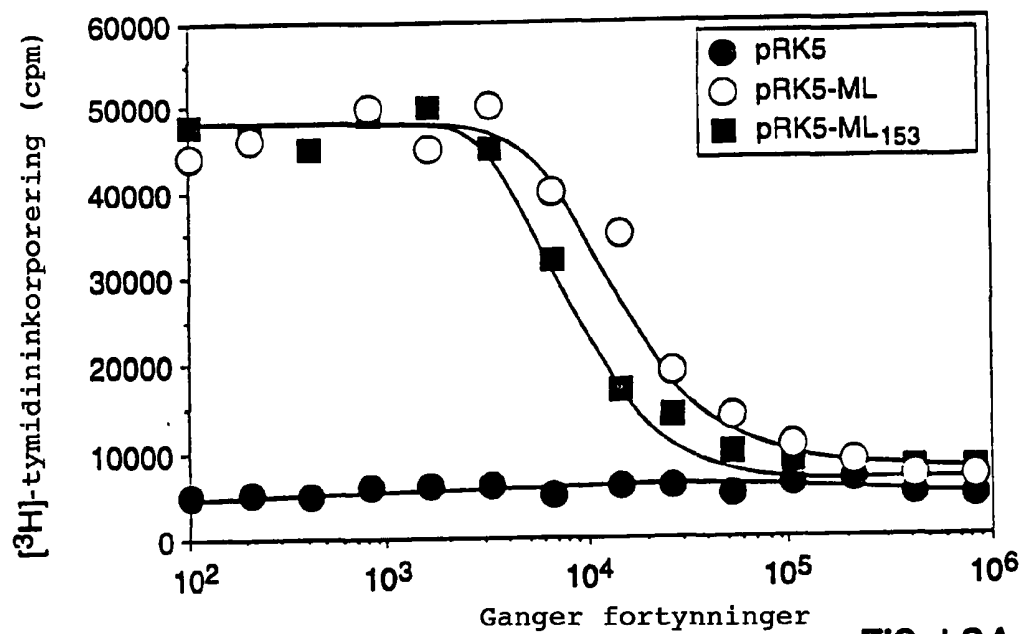


FIG. 1 2A

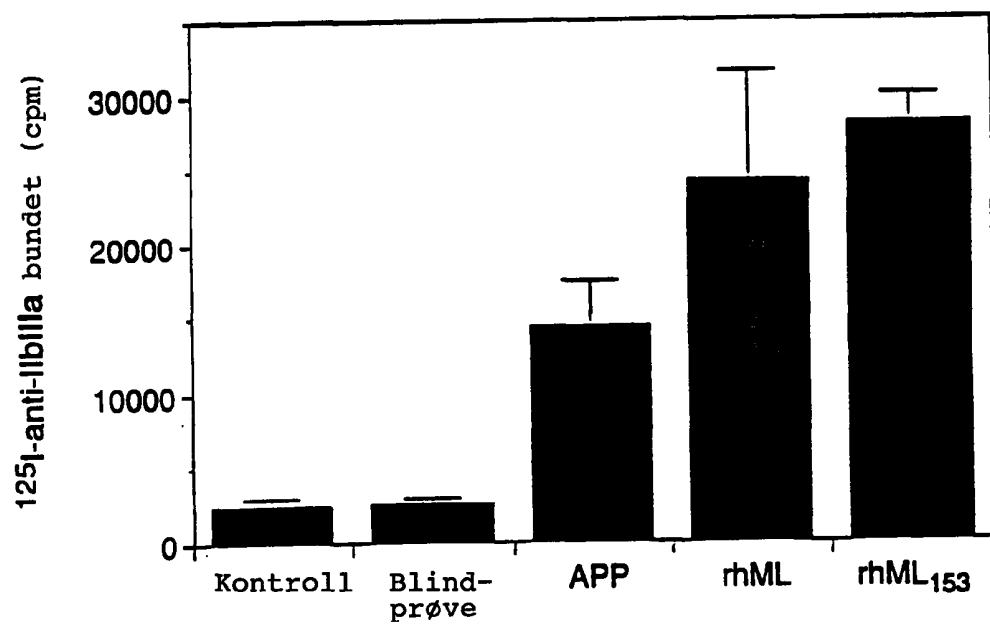


FIG. 1 2B

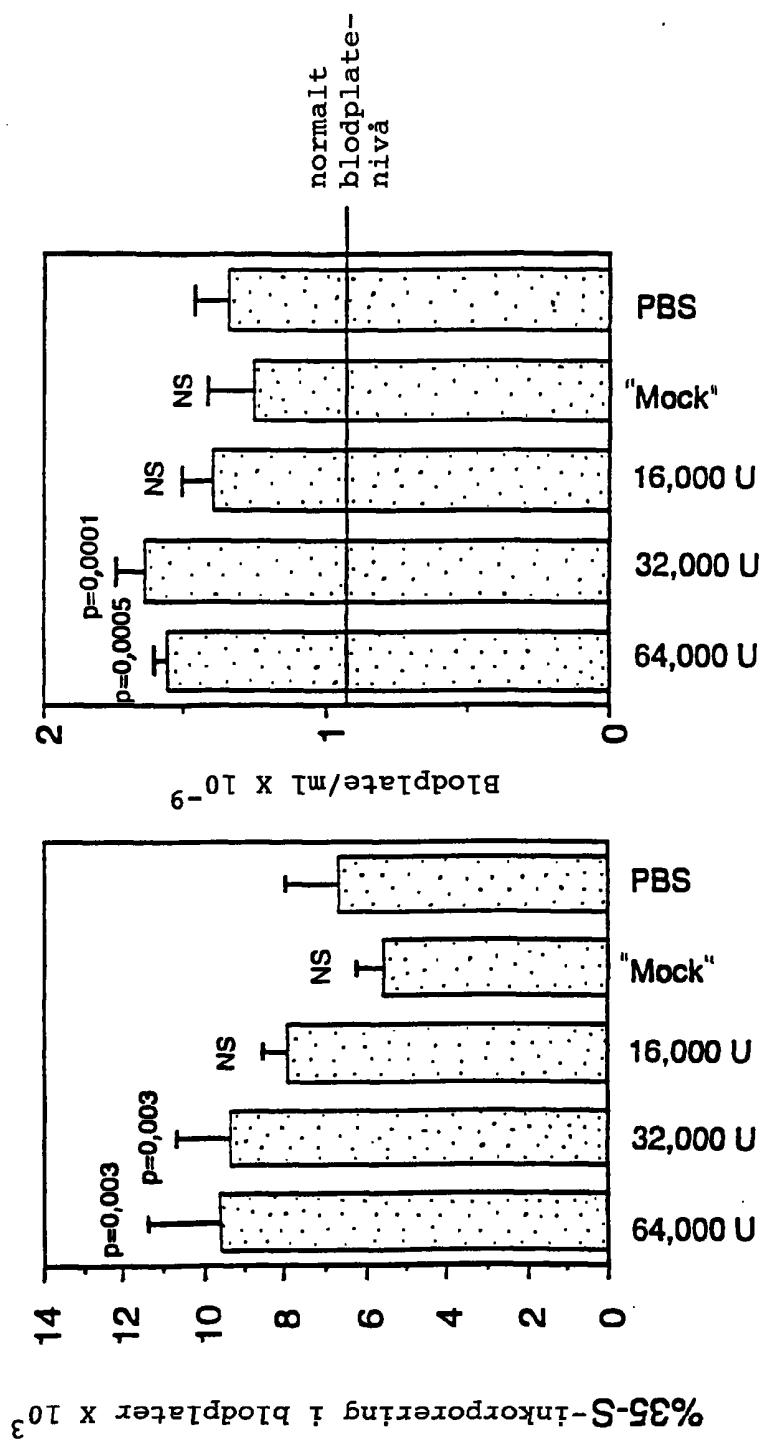
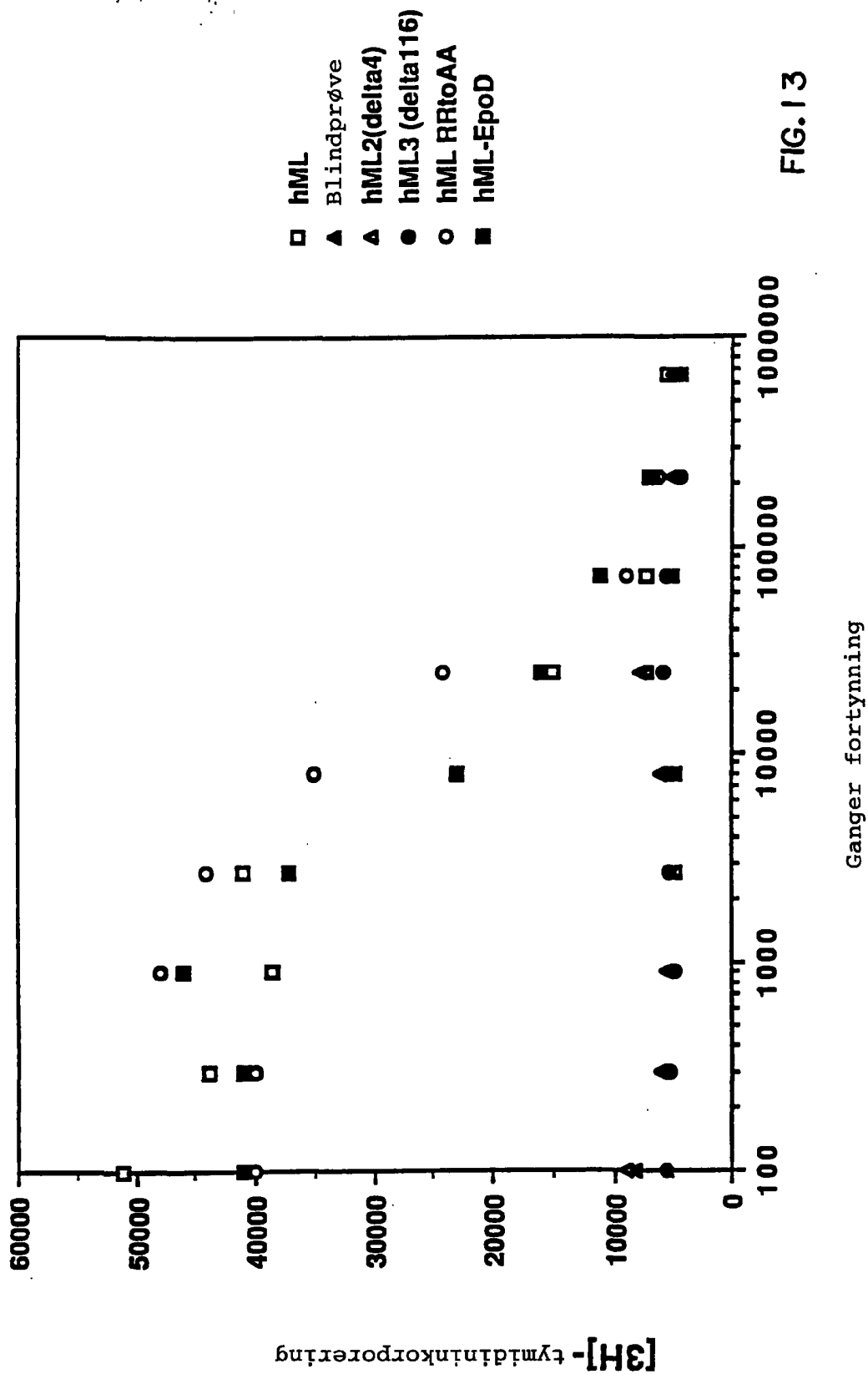


FIG. 12C



9 ValValMetLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProAlaCysAspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisVal
3301 GTGGTCAAGCTTCTCCCTAAAGGCTAAAGGCTGTTCAGCCCGGCTCCTCTGCTGTGTGACCTCCGAGTCCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATG

Slutt på signalpeptid

43 LeuHisSerArgLeu

3401 TCCTTCACAGCAGACTGtgagaaactcccaacattatcccccttatccgcgtaactggtaaagacacccatactcccaggaaagacacccatcacttccctcta

3501 actccttgaccaccaatgactattcttcccataattgtccccacactactgatcacactctctgacaagaattattcttcacaatacacagcccgcatttaaaagc

3601 tctcgtctagagatagtagtactcatgaggactagcctgcttattaggctaccatagctctctctattctcagctccctctctccccccaccaaatctttttctcaa

< Ekson 4 >

48 SerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMet

3701 cagAGCCAGTGGCCAGAGGTTCAACCTTTGCCTACACCTGTCTGCTGCCTGTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAAATGGAAAAACCCACAGATGgtaagaaagc

3801 catccctaacccttggcttcccctaagtccctgtcttccagtttcccactgcttcccattggtattctccaacattcttggagctttttaaaaaatatctcaccttca

3901 gcttgccaccctaaccctaactctacattcaacctatgatgatgcctgtggaataagatgatggcttgagggtcccaatatgtgaatagatttgaagctgaac

4001 accatgaaaaagctggagagaaaatcgctcatggccatgccttttgacctattccygttcagctctctttaaattggcatgaagaagcaagactcatatgtcat

4101 ccacagatgacacaaaagctgggaagtaccactaaaaataacaaaagactgaatcaagattcaaaatcactgaaagactagggtcaaaaaacaaggtgaaacaac

4201 agagataaaaacttctacatgtggccggggggtcacgcctgtaatcccagcactttgggaggccgaggcagagatcacctgaggggcaggagtttgag

4301 agcagcctggcccaacatggcgaaaaccccgctctctactaagaatacaaaaattagccgggcatggtagtgcatgcctgtaatcccagctacttgggaaggctg

4401 aagcaggagaaatcccttgaaacccaggagggtggagggttgtagtgagctgagatcatgccaatgcactccagcctgggtgacaagagcaaaaactccgtctca

4501 aaaagaaaaaaattctacatgtgtaaaattaatgagtaaaagtcctattccagcttccaggccacaatgccctgcttccatcatttaagcctctggccct

4601 agcacttccctacgaaaaaggatctgagagagaattaaaattgcccccaaaacttaccatgtaacattactgaagctgctattctttaaagctagtaattcttctct

4701 gtttgatgttagcatccccatttggaatatgctcgtagaagaactctattccgagtggaactacacttaaaatatatactggcctgaacacccggacatccccct

4801 gaagacatatgtctaatttattaagaggggaccataattaaaactaacatgtgtctagaaaagcagcagcctgaacagaaagagactagaagcatgttttatggg

FIG. 14C

4901 caatagtttaaaaaactaaatctatcctcaagaacccctagggtcccttcttccctcaggactgagtcagggaagaaggcagttcctatgggtcccttc
5001 tagtccttttcttttccatcctttagatcatatggttagagtcctacacatttagtttattattattattattttgagacggagtcctcactctatccc
5101 ccaggctggagtgagtgccatgattctcaactcactgcaacctcagcctcccggattcaagcattctcctgcctcagtcctcccaagtagctgggattac
5201 aggtgcccaccaccatgcccagctaatttttgtatttttggtagagatgggtttccaccatggtggccaggctgattcttgaactcctgacctcagggtgat
5301 ccacctgcctcagcctcccaaaagtctgggtattacaggcgtgagccactgcacccagccttcattcagtttaaaatcaaatgatcctaagggttttgcag
5401 cagaaagagtaaatgtgagcactagaaccaagaggtataaagctgtaacagggcagatttcagcaacgtaagaaaaaaggagctcttctcactgaaaaaca
5501 agtgaagaccaggctggactagaggacacgggagtttttgaagcagaggctgattgaccagctgtcgggagactgtgaaggaaattcctgccctgggtggg
5601 accttggtcctgtccagttctcagcctgtatgattcactctgtggtactcctcaaggctccccaccgcttttagtgtgccctttgaggcagtgcgctt
N 77 < Ekson 5 >
O GluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeu
5701 ctctcttccatctcttctcagGAGGAGACCAAGGCACAGGACATCTGGGAGCAGTGACCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACCTG
5801 GGACCCACTTGCCCTCTCATCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGCTCTCCTCTCTGGGGCCCTGCAGAGCCTCCTTGGAAACCCAGGtaagtcccc
5901 agtcaagggtatctgtagaaaactgttcttctgactcagtcctcactagaagacctgagggaagaagggtcttccaggagctcaagggcagaagagctg
6001 atctactaagagtgtcctcctgccagcccacaaatgcctgggtactggcatcctgtcttcttctacttagacaaggaggcctgagatctggccctggtgtttg
133 < Ekson 6 >
LeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArg
6101 GCCTCAGGACCATCCTCTGCCCTCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTCTTGAGTTTCCAAACACCTGCTCCG
===== ^Alternativt spleisesete
^C for cDNA-klon
158 GlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeu
6201 AGGAAAGGTGCGTTTCTTGATGCTTGTAGGAGGGTCCACCTCTGCGTCAGCGGGCCCCACCCACACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCCTC
^Slutt på EPO-domene
191 ThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGly
6301 ACACCTGAACGAGCTCCCAACACAGGACTTCTTGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGG

FIG. 14D

225 PheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThr
6401 GATTCAGAGCCAAAGATTCCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTCTTGAATGGAAC

258 ArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnPro
6501 TCGTGGACTCTTTCCCTGGACCCCTCAGCAGGACCCCTAGGAGCCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCACCTCCAGCCT

291 GlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeu
6601 GGATATTCTCTTCCCCAACCCCATCTCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCCCTGC

325 ProAspProSerAlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly:STOPP
6701 TTCTCTGACCCCTTCTGTCTCCAAACGCCCTACCCCTTCTTAAACACATCTTACACCCACTCCAGAAATCTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCA

6801 GACACTGCCGACATCAGCATTTGTCTCATGTACAGCTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAACTGGACAAAGATTTCCTACTTTCTCTCTGAAACCC
6901 AAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAGGGAAATCATTTTTTCACTGTATATAAACCCTTCAGAAAGCTATTTTTTAAGCTATCAGCAATAC

7001 TCATCAGAGCAGCTAGCTCTTTTGGTCTATTTTCTGCAGAAATTTGCAACTCCTGATTTCTCTACATGCTCTTTTCTGTGTGATAACTCTGCMAAGGCCTGG
7101 GCTGGCCTGGCAGTTGAACAGAGGGAGAGACTAAACCTTGAGTCAGAAACAGAGAAAGGGTAATTTCTTTTGCCTTCAAATTCAGGCCTTCCAAACGCCCC

7201 CATCCCCCTTACTATCATTTCTCAGTGGGACTCTGATCCCCATATTCTTAAACAGATCTTTTACTCTTGAGAAATGAATAAGCTTTCTCTCAGAAagtgtgcc
PolyA-sete

7301 ctatacactagacaaaaactgagcctgtataaggaataaaatgggagcgccgaaagctccctaaaaagcaagggaagaagatgttcttcgaggggtggcaaatag
7401 atccccctcacctgcccacccccaaaaaagctaacaggaagccttggagagcctcacaccccaggtaaggctgtgtagacagttcagtaaagacagg
7501 acctggatgtgacagctgagcaaacagctagagcttbtggcagctcagcaggagccttbtggcaggcatggacgcctcctcctcctgtggaggtcaggag
7601 gaagtgcaggaaagtggcatgagtcaggctcctbtgagctcacacagcaggagaacaagtaacaagttgaaggctcatcttccccagttccccgc
7701 aaatgcatctaaaaagcagctctgtgtgaccaccataaaactctgtaggggatctcttaaaaaaggagtcaggccttatggggccttbtgcaaaataagtgctgcc
7801 ttgggtgctcaggaaaaagggttbtgtgtgcacaaaaacacaaattccactgc

FIG. 14E

ML332

ML153

— 200

— 116
— 97

— 66.3
— 55.4

— 36.5
— 31.1

— 21.5

FIG. 15

1 GAGTCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCGA CTCTGCCGAA AGAGCACAG AAGTCAAGC CGCTCCATG GCCCCAGGA AGATTTCAGG GAGAGGCCCC
↓
101 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCT TAGACACCT GGCAGAGATG GAGCTGACTG ATTTGCTCTT GCGGCCATG CTCTTGACG TGCAAGACT AACTCTGTCC
↓
SerProVala laProAlaCy saspProArg LeuLeuAsnL ysLeuLeuAr gAspSerHis LeuLeuHis erArgLeuSe rGlnCysPro AspValaspPro
201 AGCCCCGTAG CTCTGCCTG TGACCCCGA CTCTTAATA AACTGCTGCG TGACTCCAC CTCTTCACA GCGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTCGACC
↓
LeuSeril eProValLeu LeuProAlav alaSpPheSe rLeuGlyGlu TrpLysThrG InThrGluG1 nSerLysAla GlnAspIleL euGlyAlaVal
301 CTTTGTCTAT CCTGTCTG CTGCCTGCTG TGACTTTAG TGCGGAGAA TGGAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGCAGT
↓
SerLeuLeu leuGluGlyV alMetAlaAl aArgGlyGln LeuGluProS erCysLeuSe rSerLeuLeu GlyGlnLeuS erGlyGlnVa lArgLeuLeu
401 GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCTT CCTGCCTCTC ATCCTCTCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC
↓
LeuGlyAlaL euGlnGlyLe uLeuGlyThr GlnGlyArgT hrThrAlaHi sLysAspPro AsnAlaLeuP heLeuSerLe uGlnGlnLeu LeuArgGlyLys
501 TTGGGGGCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CCTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGACCC AATGCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAACATG CTTGGGGAA
↓
ValArgPh eLeuLeuLeu ValGluGlyP roThrLeuCy sValArgArg ThrLeuProT hrThrAlaVa lProSerSer ThrSerGlnL euLeuThrLeu
601 AGGTGCGCTT CCTGCTTCTG GTAGAAGGTC CCACCTCTG TGTCAGACGG ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT

FIG. 16A

701	AsnLysPhe ProAsnArgT hrSerGlyLe uLeuGluThr AsnPheSeRV alThrAlaAr gThrAlaGly ProGlyLeuL euSerArgLe uGlnGlyPhe CCAACAAGTTC CCAACACAGGA CTCTCGAATT GTTGAGACG AACTTCAGTG TCACAGCCAG AACTGTCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTC	170	180	190	200
801	ArgVallYsI leThrProGI yGlnLeuAsn GlnThrSerA rgSerProVa lGlnIleSer GlyTyrLeuA snArgThrHi sGlyProval AsnGlyThrHis AGAGTCAAGA TTA ~~CTCTCTGG~~ TCAGCTAAAT CA ~~AACCTTCCA~~ GGTC ~~CCCCAGT~~ CC ~~AAATCTCT~~ GGATA ~~CCTGA~~ ACAGGACACA CGGACCTGTG AATGGA ~~ACTC~~	210	220	230	240
901	GlyLeuPh eAlaGlyThr SerLeuGlnT hrLeuGluAl aSerAspIle SerProGlyA laPheAsnLy sGlySerLeu AlaPheAsnL euGlnGlyGly ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACCTTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC TCGCCCGGAG CTTTCAACAA AGCTCCCTG GCATTCAACC TCCAGGGTGG	250	260	270	280
1001	LeuProPro SerProSerL euAlaProAs pGlyHisThr PropHeProp roSerProAl aleuProThr ThrHisGlys erProProGl nLeuHisPro ACTTCTCTCCT TCTCCAAGCC TTGCTCTGA TGGACACACA CCTTCCCTC CTTACCTGC CTTGCCACC ACCCATGGAT CTCCACCCC GCTCCACCCC	290	300	310	320
1101	LeuPheProA spProSerTh rThrMetPro AsnSerThrA laProHisPr oValThrMet TyrProHisP roArgAsnLe uSerGlnGlu Thr CTGTTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AA ~~CTCTACCG~~ CCCTCATCC AGTCACAATG TACCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG	330	340	350	360
1201	GGCACTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC AAGGCGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT	370	380	390	400
1301	AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAACT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA	410	420	430	440
1401	TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT TCT	450	460	470	480

FIG. 16B

FIG. 16B

[illegible]

FIG. 17A

210 220 230
 LeuGlnGlyPheArgValLysIleThrProGlyGlnLeuAsnGlnThrSerArgSerProValGlnIleSerGlyTyrLeuAsnArgThrHisGlyProVal
 801 CTTACGGGATTACAGAGTCAAGATTACTCTGGTCAGCTAAATCAAACCTCCAGGTCCCGAGTCCCAATCTCTGGATACCTGAACAGGACACACGGACCTG
 240 250 260
 AsnGlyThrHisGlyLeuPheAlaGlyThrSerLeuGlnThrLeuGluAlaSerAspIleSerProGlyAlaPheAsnLysGlySerLeuAlaPheAsn
 901 TGAATGGAACTCATGGGCTCTTGTCTGGAACCTCACTTCAGACCCTGGAAGCTCAGACATCTCGCCCGGAGCTTTCAACAAGGCTCCCTGGCATTTCAA
 270 280 290 300
 LeuGlnGlyGlyLeuProSerProSerLeuAlaProAspGlyHisThrProPheProSerProAlaLeuProThrThrHisGlySerProPro
 1001 CCTCCAGGGTGGACTTCCTCTTCTCCAAAGCCTTGCTCTGTGATGGACACACACCCCTTCCCTCCTTCCCTGCGCTTGCCCCACCCATGGATCTCCACCC
 310 320 330
 GlnLeuHisProLeuPheProAspProSerThrThrMetProAsnSerThrAlaProHisProValThrMetTyrProHisProArgAsnLeuSerGlnGlu
 1101 CAGCTCCACCCCTGTTCTCTGACCTTCCACCACCATGCTTAACCTACCGCCCTCATCCAGTCACAATGTACCTCATCCAGGAATTTGTCTCAGG
 Thr
 1201 AAACATAGcgcggcactggcccagtgagcgtctgcagcttctctcggggacaagcttccccaggaaggctgagaggcagctgcatctgctccagatggt
 1301 ctgctttcacctaaaaggccctggggaaggatcacacgacactggagattgtaaaaatttttaggagctattttttttaacctatcagcaaatatttcacag
 1401 agcagctagcgatcttttggtctatttttcggtataaaatttgaaaaatcactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 1501 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

FIG.17B

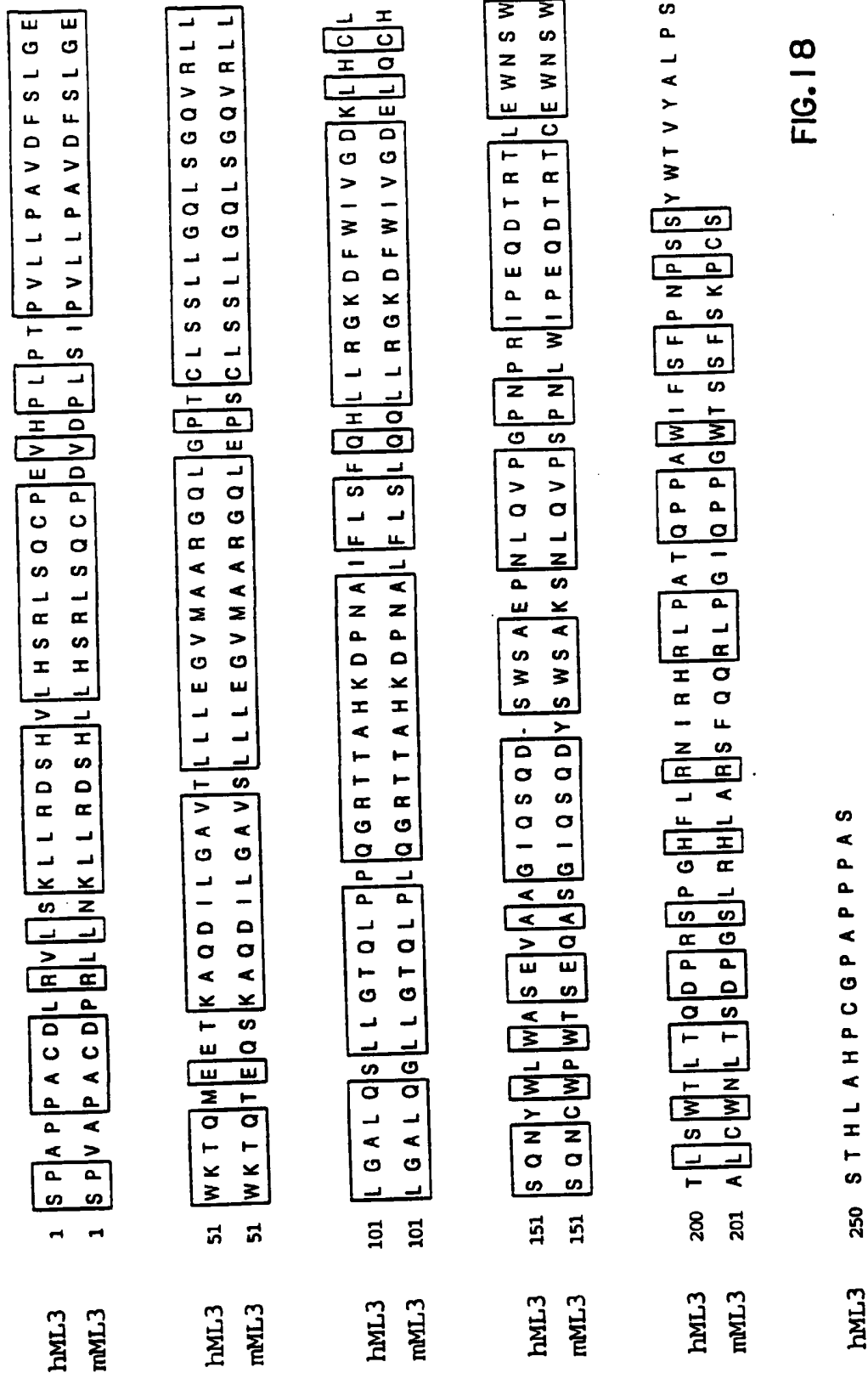


FIG.18

m-ML	1	S	P	V	A	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	L	L	H	S	R	L	S	O	C	P	D	V	D	P	L	S	I	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E
p-ML	1	S	P	A	P	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	G	R	L	S	O	C	P	D	I	N	P	L	S	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	T	L	G	E
h-ML	1	S	P	A	P	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	O	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E
m-ML	51	W	K	T	Q	T	E	Q	S	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	S	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	O	L	E	P	S	C	L	S	S	L	L	G	O	L	S	G	O	V	R	L	L
p-ML	51	W	K	T	Q	T	E	Q	T	K	A	Q	D	V	L	G	A	T	T	L	L	L	E	A	V	M	I	A	R	G	O	V	G	P	P	C	L	S	S	L	L	V	O	L	S	G	O	V	R	L	L
h-ML	51	W	K	T	Q	M	E	E	I	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	I	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	O	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	O	L	S	G	O	V	R	L	L
m-ML	101	L	G	A	L	Q	G	L	L	G	T	Q	L	P	L	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	L	F	L	S	L	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	L	V	E	G	P	T	L
p-ML	101	L	G	A	L	Q	D	L	L	G	M	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	S	A	I	F	L	N	F	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	L	V	V	G	P	S	L
h-ML	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	V	R	F	L	M	L	V	G	G	S	T	L
m-ML	151	C	V	R	R	I	L	P	T	I	A	V	P	S	S	T	S	Q	L	L	T	L	N	K	F	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	E	S	V	T	A	R	T	A	G	P	G	L	L	S	R
p-ML	151	C	A	K	R	A	P	P	A	I	A	V	P	S	S	T	S	P	F	H	T	L	N	K	L	P	P	T	S	G	L	L	E	T	N	E	S	I	S	A	R	T	I	G	S	G	F	L	K	R	
h-ML	151	C	V	R	R	A	P	P	T	I	A	V	P	S	R	I	S	L	V	L	T	L	N	E	L	P	N	R	R	S	G	L	L	E	T	N	E	T	A	S	A	R	T	I	G	S	G	L	L	K	W
m-ML	201	L	Q	G	F	R	V	K	I	T	P	G	Q	L	N	Q	T	S	R	S	P	V	Q	I	S	G	V	L	N	R	I	H	G	P	V	M	G	I	H	G	L	F	A	G	I	S	L	Q	I	L	E
p-ML	201	L	Q	A	F	R	A	K	I	-	P	G	L	L	N	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	H	O	N	G	I	H	G	P	L	S	G	I	H	G	L	F	P	G	P	Q	P	G	A	L	G
h-ML	201	Q	Q	G	F	R	A	K	I	-	P	G	L	L	N	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	V	L	N	R	I	H	E	L	N	G	T	R	G	L	F	P	G	P	S	R	R	T	L	G	
m-ML	251	A	S	D	I	S	P	G	A	F	N	K	G	S	L	A	F	N	L	Q	G	G	L	P	P	S	P	S	L	A	P	D	G	H	-	T	P	F	P	P	S	P	A	L	P	I	T	H	G	S	P
p-ML	250	A	P	D	I	P	P	A	T	S	G	M	G	S	R	P	T	Y	L	Q	P	G	E	S	P	S	P	A	N	P	S	P	G	R	Y	T	L	F	S	P	S	P	T	S	P	S	-	-	P	T	
h-ML	250	A	P	D	I	S	S	G	T	S	D	T	G	S	L	P	P	N	L	Q	P	G	Y	S	P	S	P	T	H	P	T	G	Y	T	L	F	P	L	P	T	L	P	T	-	-	-	P	V			
m-ML	300	P	Q	L	H	P	L	F	P	D	P	S	I	T	M	P	N	A	S	T	A	P	H	P	V	I	M	Y	P	H	P	R	N	L	S	Q	E	I													
p-ML	297	V	Q	L	Q	P	L	L	P	D	P	S	A	I	T	P	N	A	S	T	S	P	L	L	F	A	A	H	P	H	F	O	L	S	Q	E	E														
h-ML	297	V	Q	L	H	P	L	L	P	D	P	S	A	P	T	P	T	S	P	L	L	T	E	S	Y	T	H	S	Q	N	A	S	Q	E	G																

FIG. 19

10 20 30
 SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAasnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAasnPro
 1 AGCCCGGCTCCTCGCTGCTGACCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTACGGCAGACTGAGCCAGTGCCTCCAGACATTAACC
 40 50 60
 LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAspPheThrLeuGlyGluTyrLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr
 101 CTTTGTCACACCTGCTCGCTGCTGAGCTTCACCTTGGGAGAAATGGAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGGATGTCTTGGGAGCCAC
 80 90 100
 ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
 201 AACCTTCTGTGGAGCAGTGATGACAGCAGCGGGACAAGTGGGACCCCTTGCCTCTCATCCCTGCTGGTGACGCTTCTTGGACAGGTTCGCCTCCTC
 110 120 130
 LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAasnPheGlnGlnLeu
 301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGAAATGCAGCTTCCTCCACAGGAAGGACCACAGCTCACAAAGGATCCCGAGTCCCATCTTCTTGAACCTTCCAACAAC
 140 150 160
 LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerPro
 401 TGCTCCGAGGAAAGGTGCTTCTGCTTCTTGTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGCCATAGCTGTCTCCGAGCAGACCTCTCTCC

FIG. 20A

170 180 190 200
PheHisThrLeuAsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArg
501 ATTCACACACTGAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTTGGAGACAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTTCTCAAGAGG

210 220 230
LeuGlnAlaPheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSer
601 CTGCAGGCATTTCAGAGCCCAAGATTCTCTGGTCTGTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTAGACCAAAATCCCTGGACACCCAGAAATGGGACACACCGACCCCTTGA

240 250 260
GlyIleHisGlyLeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeu
701 GTGGAATTTCATGGACTCTTTCTGGACCCCAACCCCGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGGCCAACCTACCT

270 280 290 300
GlnProGlyGluSerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProSerProThrValGlnLeuGln
801 CCAGCCTGGAGAGTCTCCTTCCCCAGCTCACCCCTTCTCTCTGGACGATACACTCTCTCTCTCTCCCTTCCACCCACCTCGCCCTCCCCACAGTCCAGCTCCAG

310 320 330
ProLeuLeuProAspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu
901 CCTCTGCTTCTCTGACCCCTCTGGGATCACACCCAACTCTACCAGTCTCTCTATTTGCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAG

1001 GTGCTCAGACCCCTGCCAACTTCAGCA

FIG.20B

10
 SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAasnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAasnPro
 1 AGCCCGGCTCCTCGCTGACCCCGACTCTCTAAATAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTCACGGCAGACTGAGCCAGTGCCTGGAGCATTAAC

20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160

LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAlaAspPheThrLeuGlyGluTyrLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuLeuGlyAlaThr
 101 CTTTGTCCACACCTGTCTGCTGCTGTGGACTTCACCTTGGGAGAATGGAAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGGATGTCTTGGGAGCCAC

ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
 201 AACCTTCTGTCTGGAGCAGTGATGACAGCACGGGACAAAGTGGGACCCCTTGCTCTCATCCCTGCTGGTGCAGCTTTCTGGACAGGTTCCGCTCCCTC

LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAasnPheGlnGlnLeuLeuArgGlyLys
 301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGAAATGCAGGGAAGGACCACAGCTCACAAAGATCCCAAGTCCCATCTTCTGAACTTCCAACAACCTGCTCCGAGGAA

ValArgPheLeuLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerProPheHisThrLeu
 401 AGGTGCGTTTCTGTGCTGCTGTTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGTGCCAAGAGGGCCCCACCGCCCATAGCTGTCTCCGAGCAGCACCTCTCCATTCCACACACT

FIG. 21 A

170 AsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArgLeuGlnAlaPhe 200
 501 GAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTTGGAGACAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTTCTCAAGAGGCTGCAGGCATTC 230
 210 ArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSerGlyIleHisGly 230
 601 AGAGCCAAGATTCTCTGGTCTGTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTTAGACCAAAATCCCTGGACACCCAGAATGGGACACACACGGACCCCTTGAGTGGAAATTCATG 260
 240 LeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeuGlnProGlyGlu 260
 701 GACTCTTTCTCGGACCCCAACCCGGGGCCCTTCGGAGCTCCAGACATTCTCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGGCCAACCTACCTCCAGCCTGGAGA 300
 270 SerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProThrValGlnLeuGlnProLeuLeuPro 300
 801 GTCTCCTTCCCCAGCTCACCCCTTCTCCTCGGACGATACACTCTCTCTCTCTCCTTACCCACCTCGCCCTCCCCCACAGTCCAGCTCCAGCCTCTGCTTCCCT 320
 310 AspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu 320
 901 GACCCCTCTGGGATCACACCCCAACTCTACCCAGTCCCTCTTCTATTTGCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAGGTGCTCAGACCC 320

FIG.2 I B

1001 TGCCAACTTCAGCA

pML	1	SPAPACDPRLLNKLLRDSHVLRGRLSQCPDINPLSTPVLLPAVDFTLGE
pML2	1	SPAPACDPRLLNKLLRDSHVLRGRLSQCPDINPLSTPVLLPAVDFTLGE
pML	51	WKTQTEQTKAQDVLGATTTLLLEAVMTARGQVGPPCLSSLLVQLSGQVRL
pML2	51	WKTQTEQTKAQDVLGATTTLLLEAVMTARGQVGPPCLSSLLVQLSGQVRL
pML	101	LGALQDLLGMQLPPQGRTTAHKDPSAIFLNFOQLLRGKVRFLLLVVGPSL
pML2	101	LGALQDLLGM...QGRTTAHKDPSAIFLNFOQLLRGKVRFLLLVVGPSL
pML	151	CAKRAPPAAIAPSSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLETNSSISARTTSGGFLKR
pML2	147	CAKRAPPAAIAPSSSTSPFFHTLNKLPNRTSGLLETNSSISARTTSGGFLKR
pML	201	LQAFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGHQNGTHGPLSGIHGLFPGPQPGALGA
pML2	197	LQAFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGHQNGTHGPLSGIHGLFPGPQPGALGA
pML	251	PDIPPATSGMGSRPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ
pML2	247	PDIPPATSGMGSRPTYLQPGESPSPAHPSPGRYTLFSPSPTSPSPTVQLQ
pML	301	PLLPDPSAITPNSTSPLLFAAHPHFQNLQEE
pML2	297	PLLPDPSAITPNSTSPLLFAAHPHFQNLQEE

FIG.22

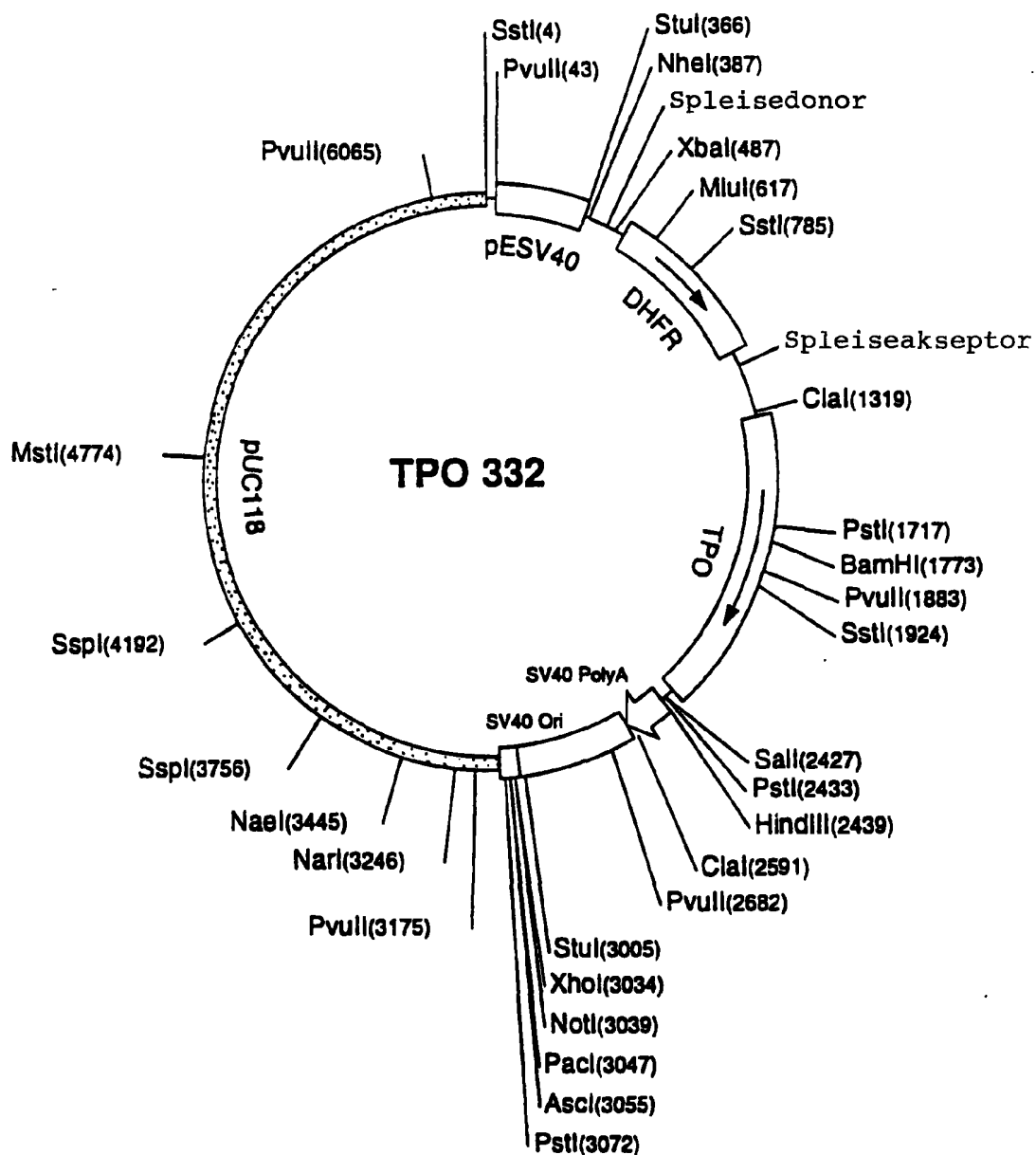


FIG.23

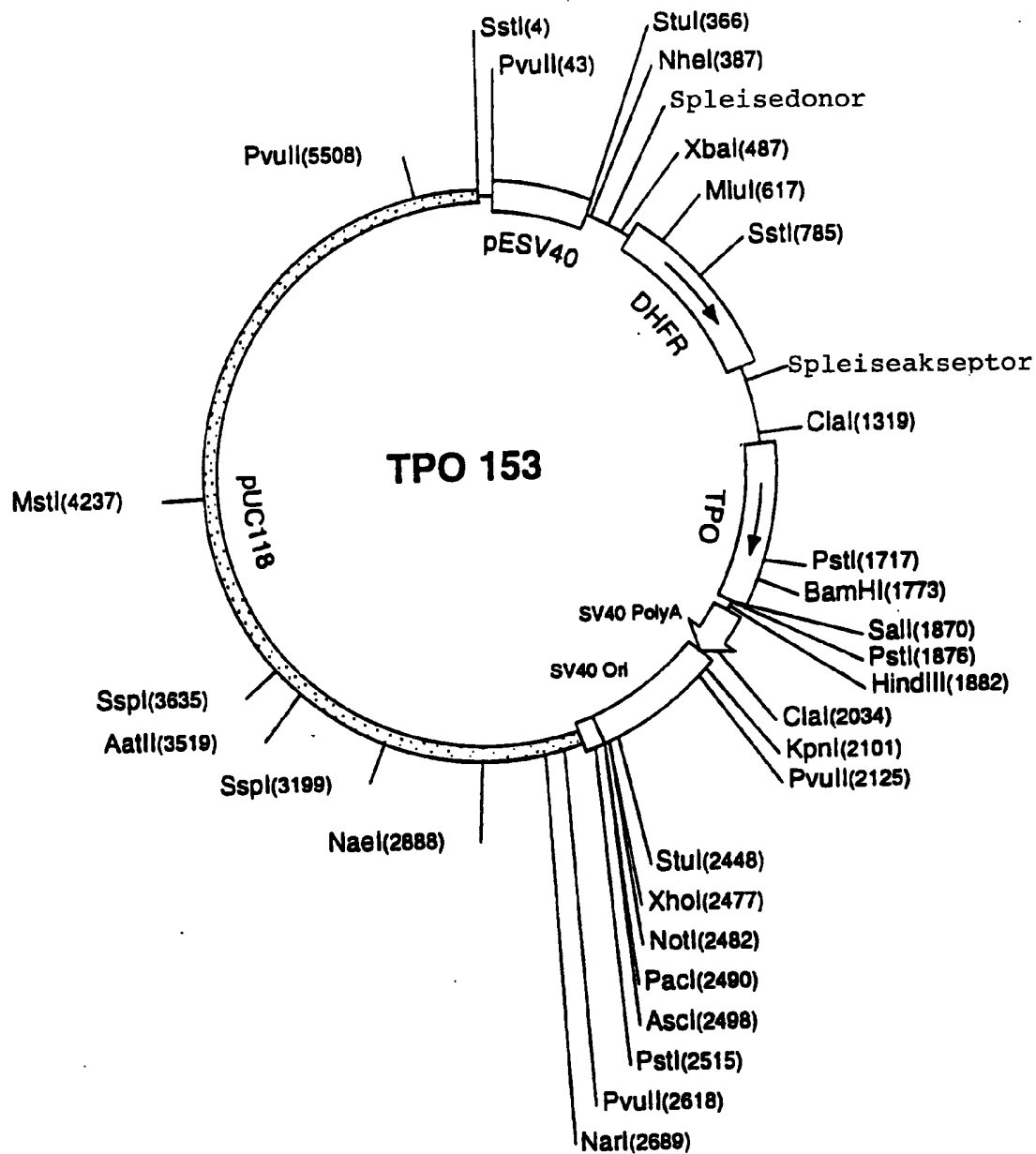


FIG.24

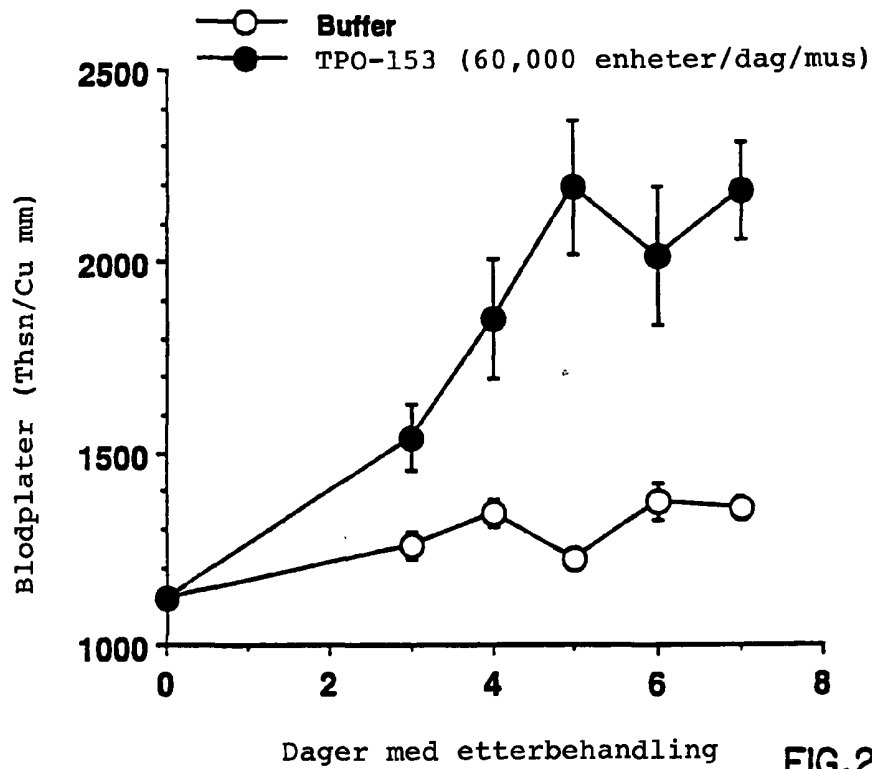


FIG.25A

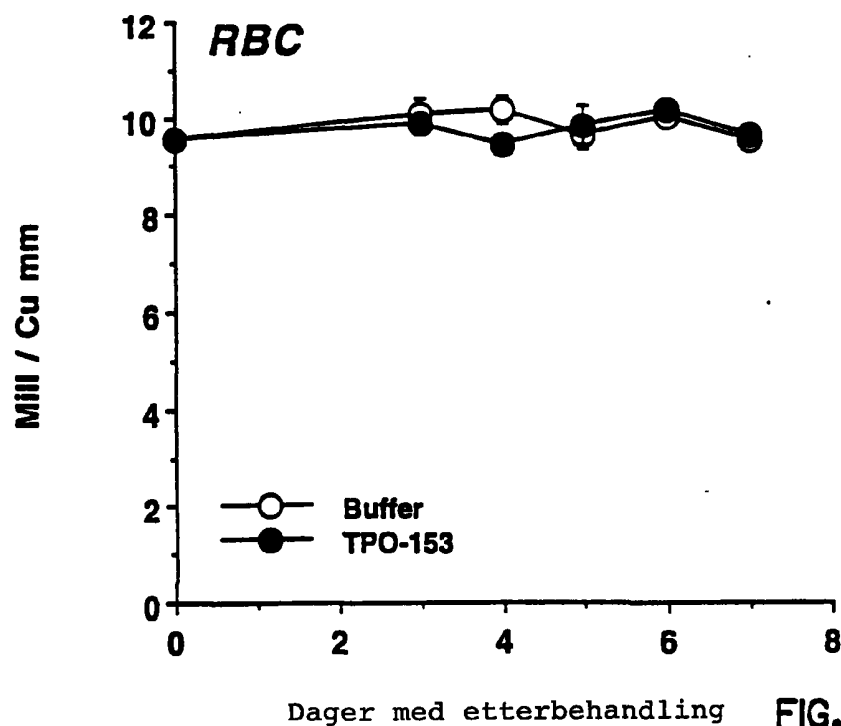


FIG.25B

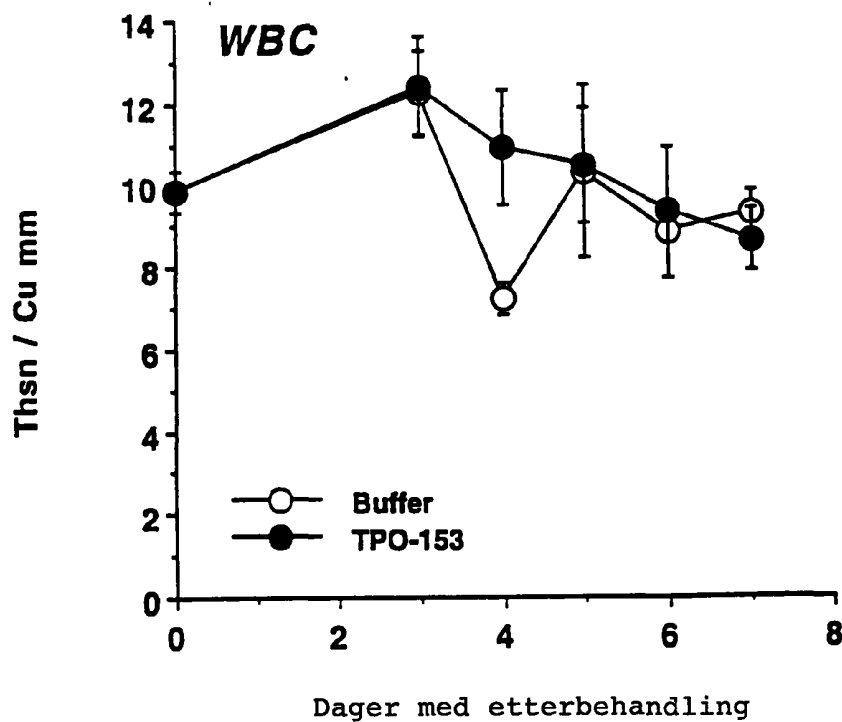


FIG.25C

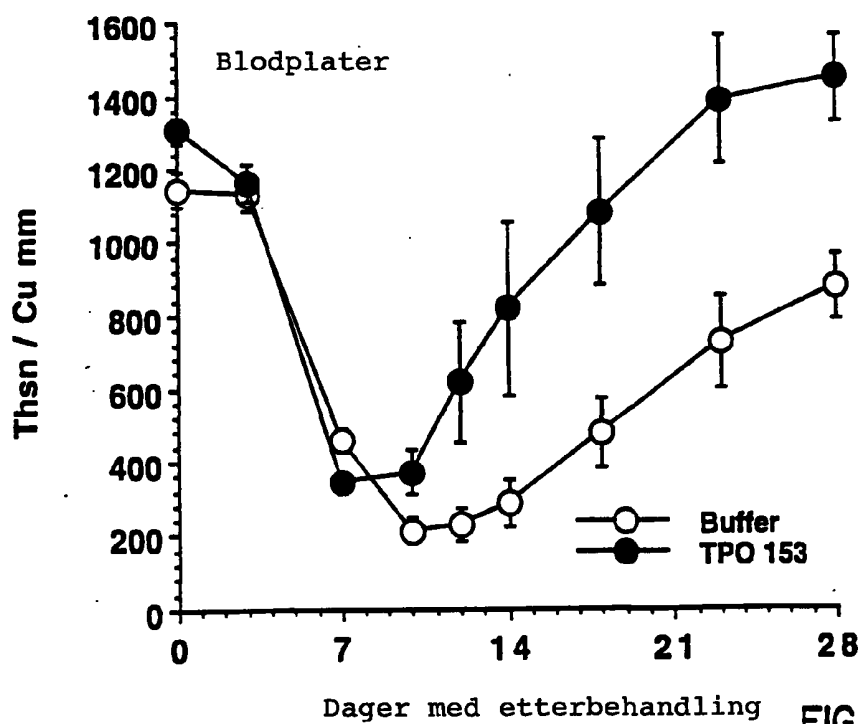


FIG.26A

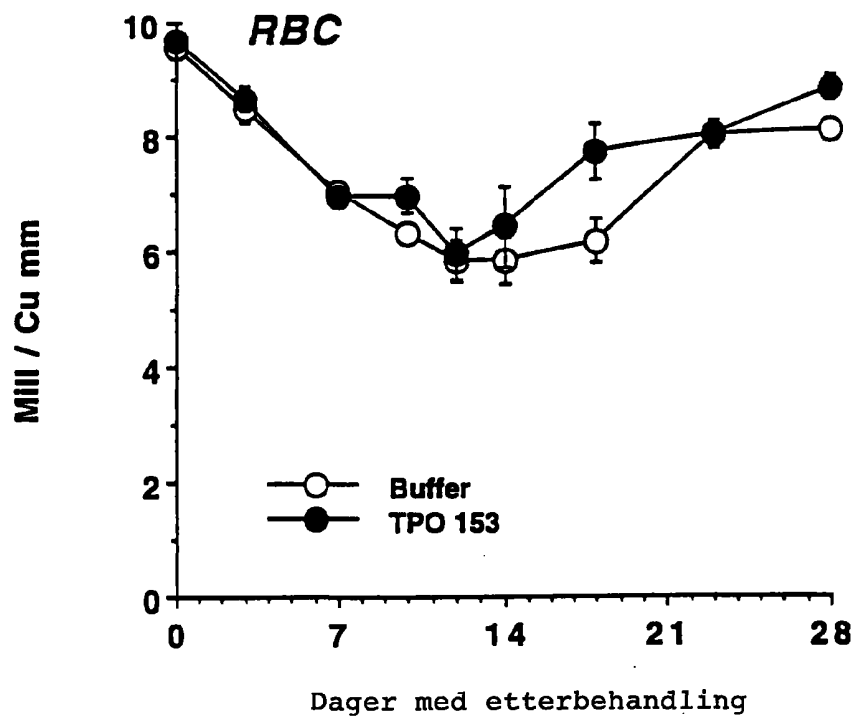


FIG.26B

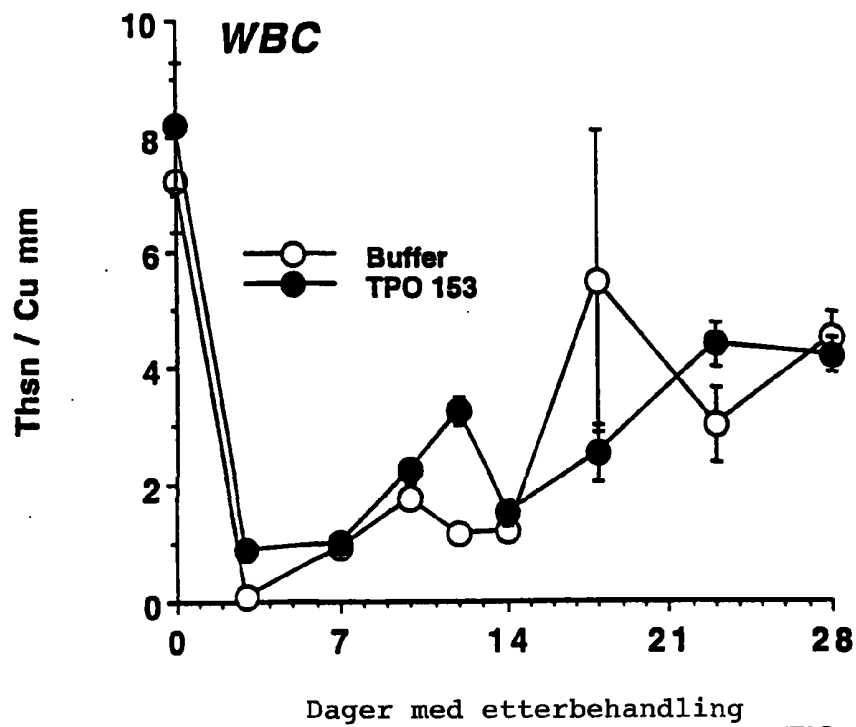


FIG.26C

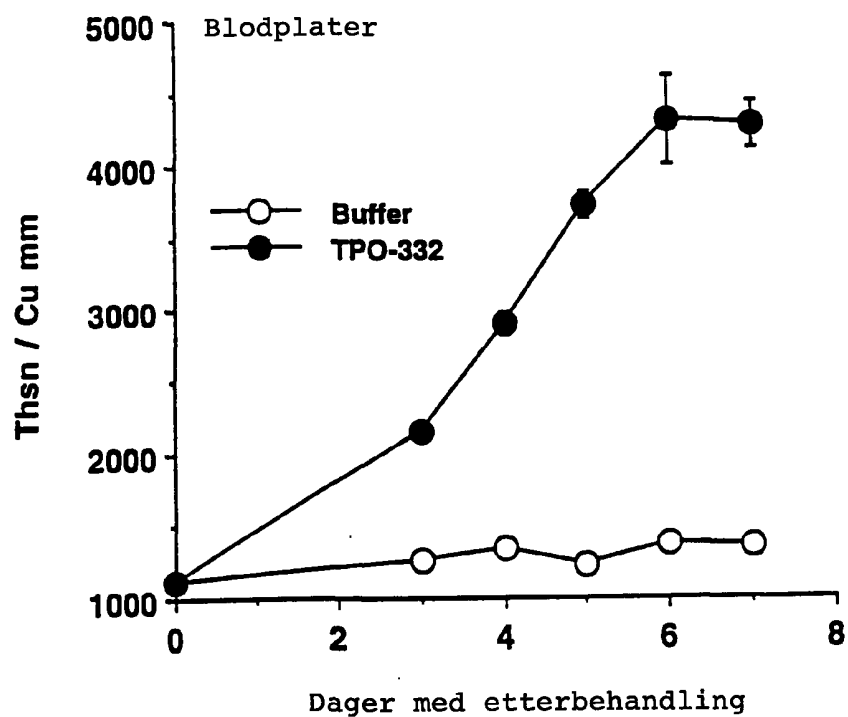


FIG.27A

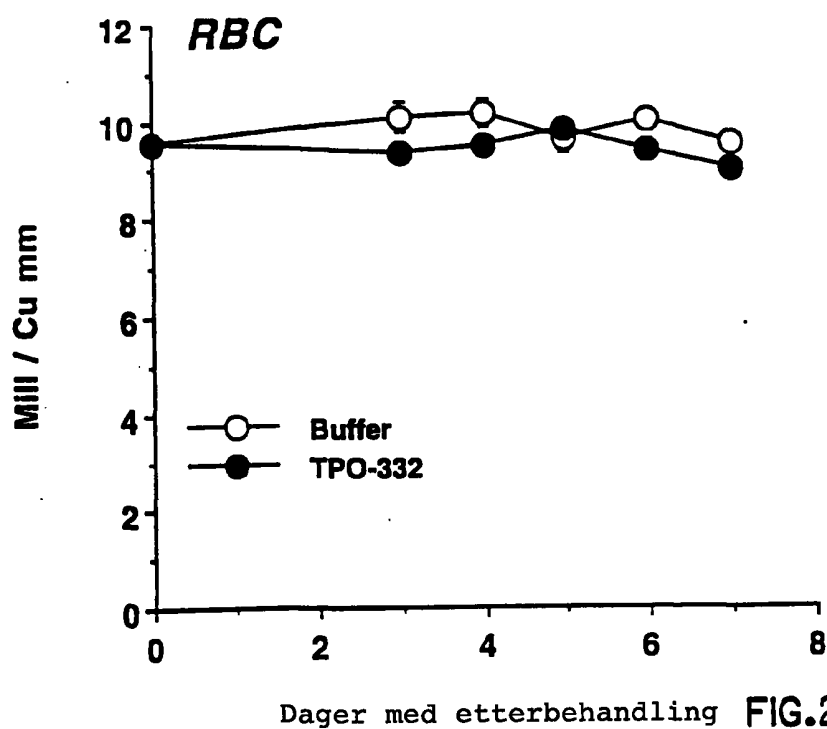


FIG.27B

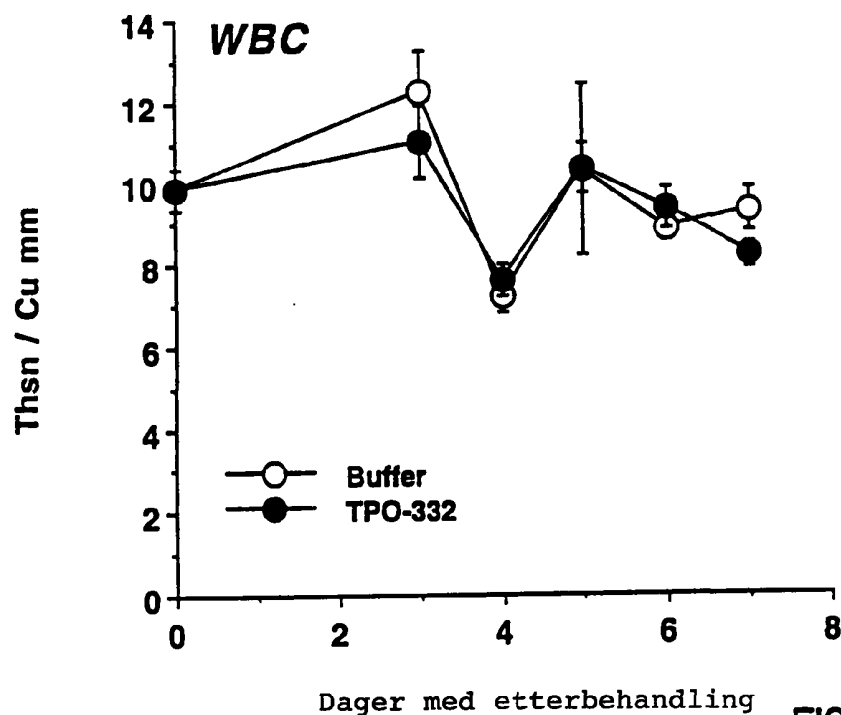


FIG.27C

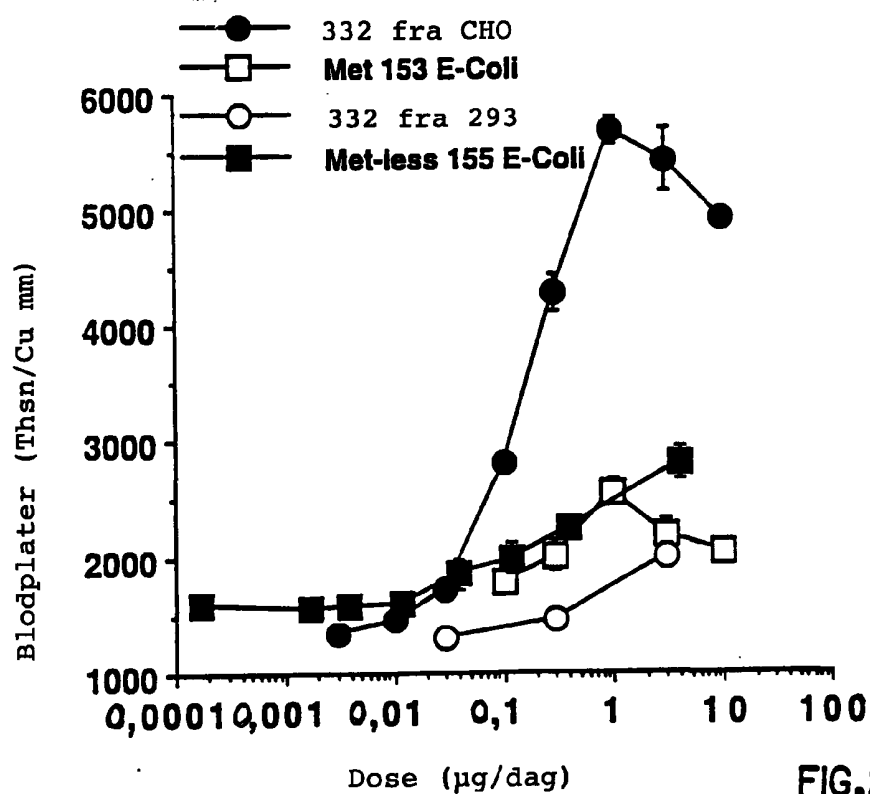


FIG.28

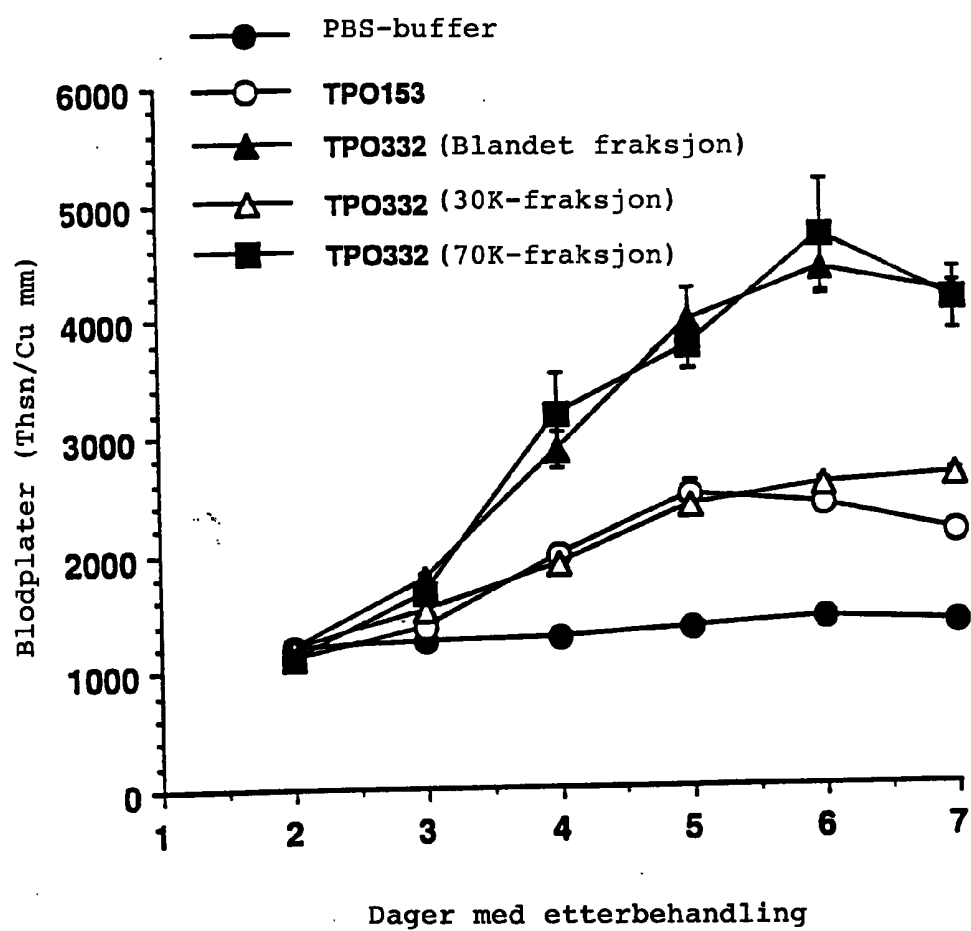
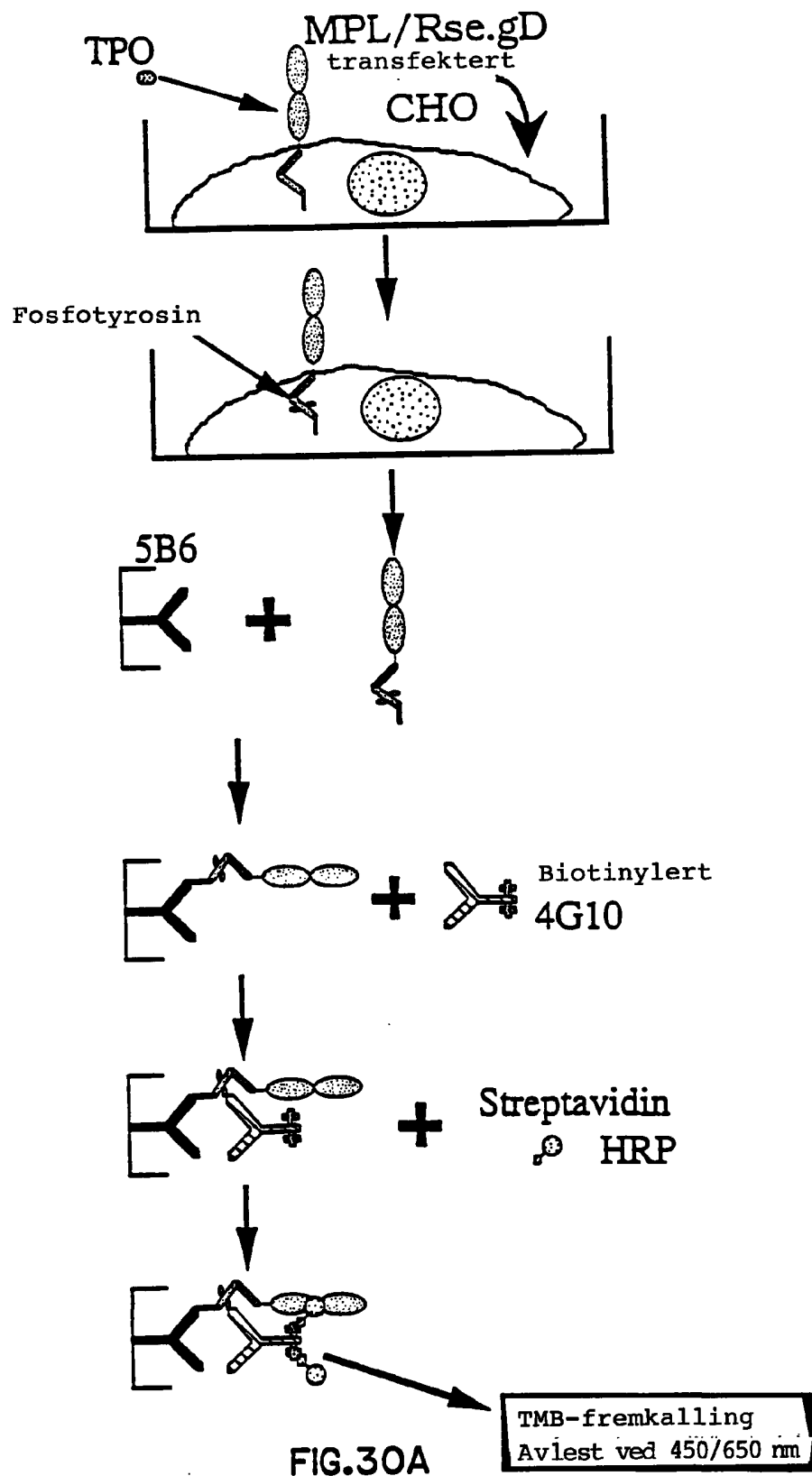


FIG.29



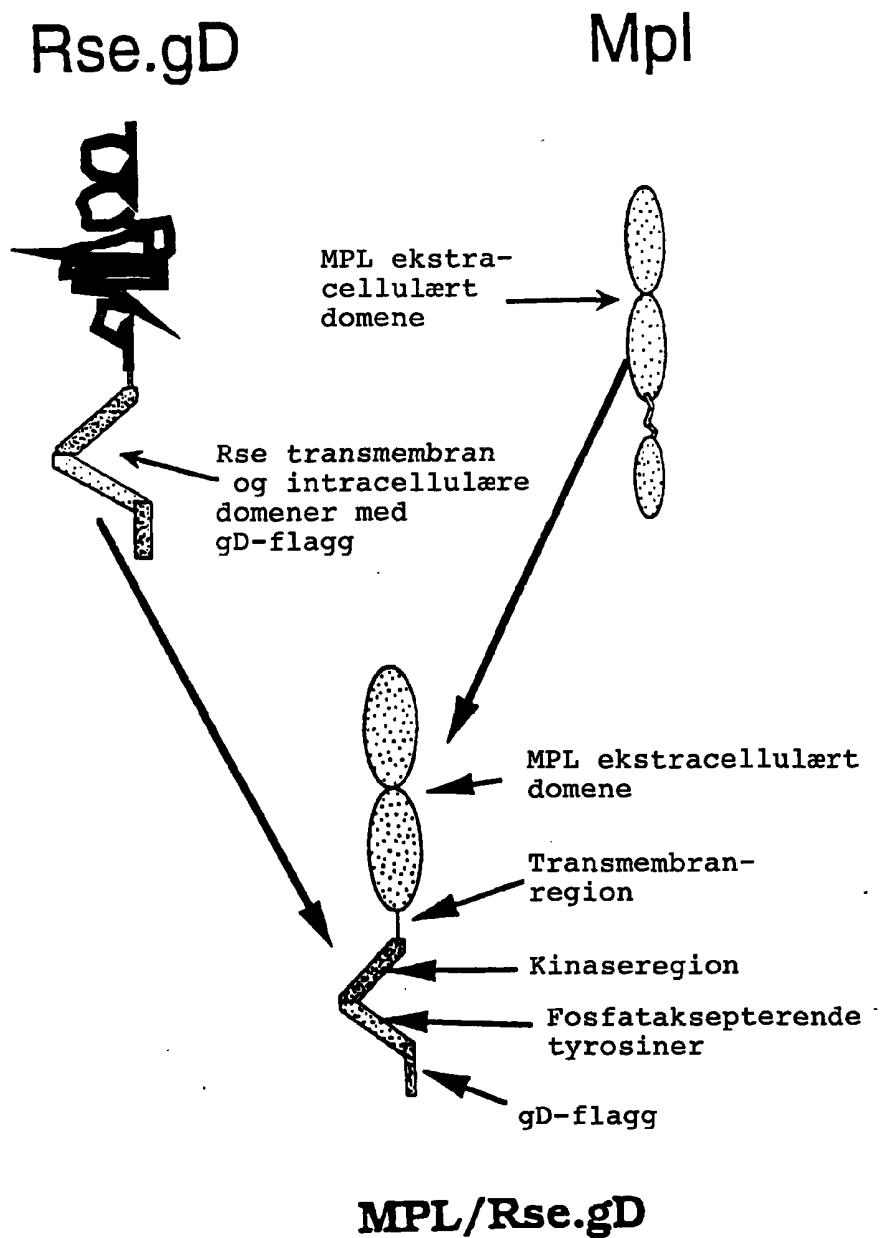


FIG.30B

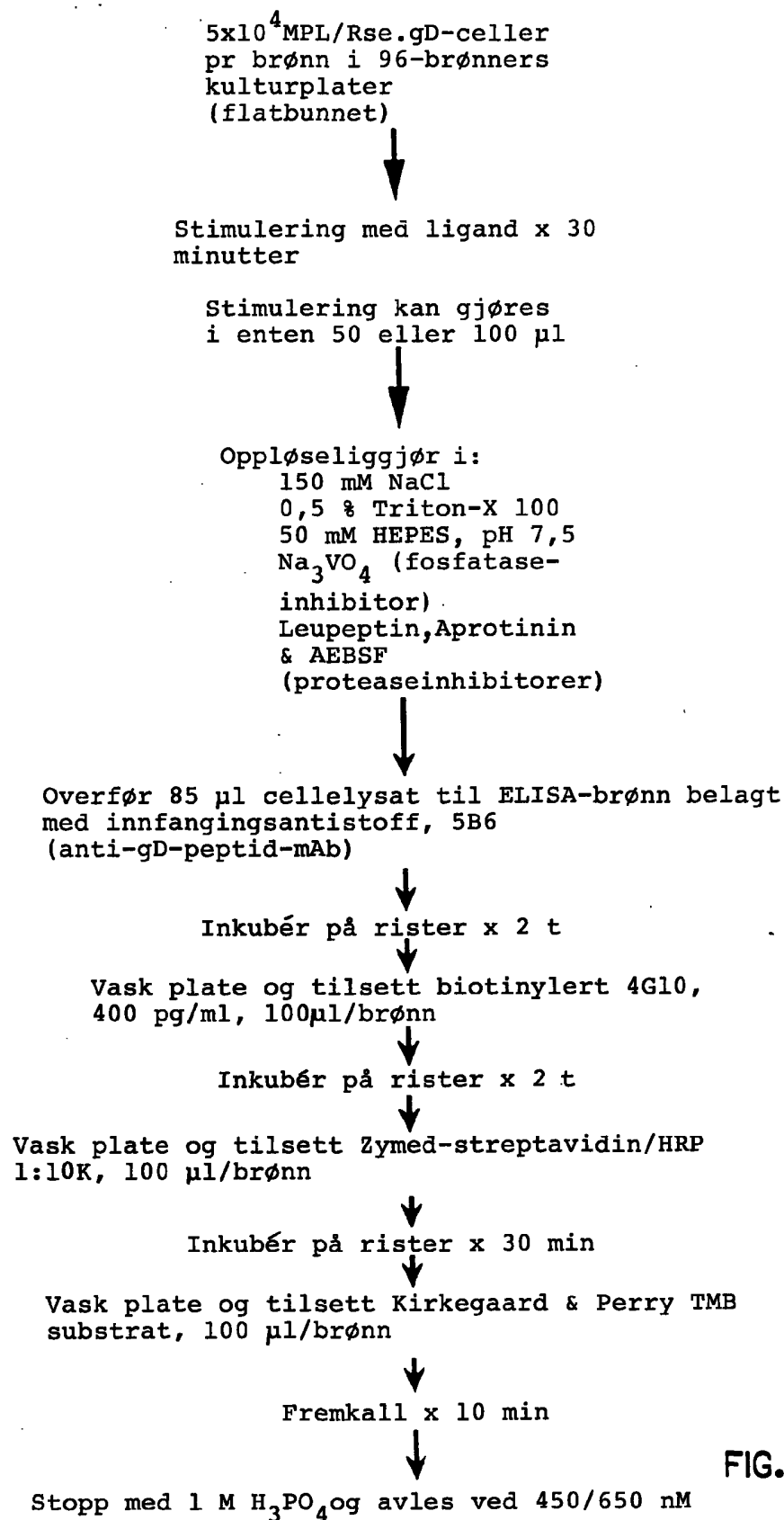


FIG.3 I

[illegible]

FIG. 32A

```

nlaIV
scrFI          sfanI          ppulOI
              nsiI/avaIII
              nlaIII
              sphI
              nspl
              nspHI
[dcM+]         bstNI         apyI[dcM+]
              bsaJI
141 GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
CACACCTTTC AGGGGTCCGA GGGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG

              nlaIII
              styl
              ncoI
              bsli dsal
              aciI bsaJI
              aciI bsrI aciI
211 ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCCACTTC CGCCCATCTT CCGCCCCCATG
TATCAGGGCG GGGATTGAGG CGGGTAGGCG GGGGATTGAG GCGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGGTAC

fnu4HI
bglI
sfiI
haeIII/palI
mnlI mnlI ddel
haeIII/palI bsaJI mnlI aluI
mnlI bsaJI aciI haeIII/palI
281 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG
CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC

```

FIG.32B


```

sstI
sacI
hgiJII
hgiAI/asphi
ec1136II
bsp1286
bsiHKA1
bmyI
banII
aluI
    bstXI
751 GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA ACAACCGGAA TTGGCAAGTA
    CCTCGAGTAA AAGAACGGTT TTCAAACCTA CTACGGAATT CTGAATAACT TGTGGCCTT AACCGTTCAT
    tru9I      mspI
    aflII/bfrI hpaI
    foki sfaI mseI bsaWI
    accI nlaIII mnlI
821 AAGTAGACAT GGT TTGGATA GTCGGAGGCA GTTCTGTTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT
    TTCACTCTGTA CCAAACCTAT CAGCCTCCGT CAAGACAAAT GGTCTTCGG TACTTAGTTG GTCCGGTGGA
    scrFI      scrFI      mvaI      mvaI
    mvaI      ecorII      ecorII
    dsav      tfil      dsav
    bstNI      nlaIII      bstNI      ddeI
    apyI(dcm+) hinfi apyI(dcm+)

```

haeIII/palI
haeI

FIG.32E

nlaIII
 sau3AI
 mboI/ndeII[dam-]
 dpnI[dam+]
 dpnII[dam-]
 pleI
 hinfI
 maeIII alwI[dam-] apoI
 maeII
 aflIII
 maeII
 891 TAGACTCTTT GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTT TCCCAGAAAT TGATTGGGG
 ATCTGAGAAA CACTGTTCT AGTACGTCCT TAAACTTTCA CTGTGCAAAA AGGTCTTTA ACTAAACCCC

hgaI
 hinfI/acyI
 ahaII/bsaHI
 scrFI
 mvaI
 mnlI
 ecorII
 dsav
 bstNI
 ecorNI
 apyI[dcm+] mnlI
 bsaJI
 bslI ddeI
 mnlI
 961 AAATATAAC CTCTCCQAGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG
 TTTATATTG GAGAGGGTCT TATGGGTCCG CAGGAGAGAC

FIG.32F

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
apyI[dcmt]
sau96I
avaII
asuI mnlI sfanI
1001 AGGTCACGGA GGAAGGAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC
TCCAGGTCCT CCTTTTCCG TAGTTCATAT TCAAACTTCA GATGCTCTTC TTTCTGATTG TCCTTCTACG
sfanI mboII
^slutt DHER

nlaIII
styI
ncoI
dsal
ppulOI
mnlI aluI nsII/avaIII bsaJI
1071 TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT ATGCATTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG
AAAGTCAAG AGACGAGGGG AGGATTTCGA TACGTAAAAA TATTCTGGTA CCTGAAAC

```

FIG.32G

52 / 85

FIG. 32H


```

sau96I
    acII haeIII/palI
    fnu4HI asuI
    bglI nlaIII
    sfiI styI
    eaeI ncoI
    cfrI dsaI
    ecorI taqI haeIII/palI
    apoI claiI/bsp106 bsaJI
1321 GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
    CCCCTTAAGT TAGCTACCGG CCGTACCGGG TTGAACAAAT AACGTCGAAT ATTACCAATG TTTATTTCGT
    ^sv40 tidlig poly A
    aluI
    fnu4HI
    bbvI
    maeIII

    rmaI
    bsmI maeI
    sfaNI apoI
1391 ATAGCATCAC AAATTTCACA AATAAAGCAT TTTTTCAC TGCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACTCAT
    TATCGTAGTG TTTAAAGTGT TTATTTCGTA AAAAAAGTGA CGTAAGATCA ACACCAAACA GGTGTGAGTA

```

FIG.32J

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+]
dpnII[dam-]
pvuI/bspCI
mcrI
taqI[dam-] tru9I
claiI/bsp106[dam-]
sau3AI mseI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] xmnI
dpnII[dam-] aseI/asnI/vspI
nlaIII alwI[dam-] asp700
1461 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAAATT
GTTACATAGA ATAGTACAGA CCTAGCTAGC CCTTAATTAA
sv40-opprinnelse^

haeIII/palI
haeI
styI
fnu4HI ncoI
bbvI dsal
hinPI bsaJI
hhaI/cfoI nlaIII
1501 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGGTTAG GTACCTTCTG AGGCGGAAAG
GCCGCGTCGT GGTACCCGAC TTTATTGGAG ACTTTCTCCT TGAACCAATC CATGGAAGAC TCCGCCTTTC

rsal
csp6I
nlaIV
kpnI
hgiCI
bani
asp718 mnlI
acc65I ddeI aciI

```

FIG.32K

[illegible]

	sfanI	scrFI	scrFI	nlaIV
	ppu10I	mvaI		
	nsil/avaIII	ecorII	ecoRII	mvaI
	nlaIII	dsav	dsav	
	sphI	bstNI		bstNI
	nspl	apyI[dcm+]		apyI[dcm+]
	nspHI	sexAI		bbsJI
1641	AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT			
	TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT CCACACCCTTT CAGGGGGTCCG AGGGGTCGTC CGTCTTCATA			

[illegible]


```

          acII      hinPI      hhaI/cfoI      bspMI
          haeIII/palI      hhaI/cfoI      scfI
          mcrI      thai      pstI
          eagI/xmaIII/ecI XI      fnuDII/mvnI
          taqI      eaeI      bstUI
          xhoI      notI      hinPI
          paeR7I      cfri      hhaI/cfoI      tru9I      sse8387I
          avai      fnu4HI      paci      ascI      ahaIII/draI
          mnlI      aciI      msel      tru9I      bsh1236I      msel      bsgI
          aluI      maeIII      bsrBI      fnu4HI      msel      bssHI      swaI
          1901 CTAGGCTTTT GC AAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAGGCG CGCCATTAA ATCCTGCAGG
              GATCCGAAA CGTTTTCGA CAATGGAGCT CGCCGGCGAA TTAATTCCGC GCGTAAATT TAGGACGTCC
              ^start pUC118
              ^lineariseringslinker innført i Hpal-sete

          scrFI
          mvaI
          ecorII
          dsav
          bstNI
          apyI[dcm+]      tru9I
          maeIII      maeII      bsri      bsaJI      maeIII      msel
          1971 TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT
              ATTGTGGAAC CGTGACCGGC AGCAAAATGT TGCAGCACTG ACCCTTTTGG GACCGCAATG GGTGAATTA

```

FIG.32N

sau3AI
sau96I mboI/ndeII[dam-]
haeIII/palI
asuI dpnI[dam+].
mnII dpnII[dam-]
mboII aciI pvuI/bspCI
earI/ksp632I mcrI
CGCCTTGCAG CACATCCCC CTTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT
GCGGAACGTC GTGTAGGGG GAAGCGGTCG ACCGCATTAT CGCTTCTCCG GCGGTGGCTA
fnu4HI
bbvI fokI
aluI
pvuII
nspBII
bglI
AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GCGGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTCTC CTTACGCATC
TTGTCAACGC ATCGGACTTA CCGCTTACCG CGGACTACGC CATAAAGAG GAATGCGTAG
CGCCCTTCCC
GCGGGAAGG
2041
2101

FIG. 320

hinPI
 thal
 fnuDII/mvni
 bstUI scfI
 bsh1236I
 rsal hhaI/cfoI fnu4HI
 csp6I bslI acII
 2171 TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAA GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC
 ACACGCCATA AAGTGTGGCG TATGCAGTTT CGTTGGTATC ATGCGCGGGA CATCGCCGCG
 fnu4HI
 thal
 fnuDII/mvni
 bctUI
 hinPI acII
 hhaI/cfoI
 tru9I acII
 mseI bsh1236I
 2231 ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 TAATTGCGCG CGCCACAC ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGCGG TCGCGGCGCG
 hinPI
 hhaI/cfoI
 rmaI
 hinPI haeII
 hhaI/cfoI bsrBI
 acII
 haeII maeI
 CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
 GGTGCGGCGG TCGCGGCGCG
 mspI
 hpaII
 naeI
 maeII cfr10I
 mboII
 2301 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GCTTCCCGG TCAAGCTCTA AATCGGGGCG
 GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGAAGCGCG CGAAAGGGG AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG
 nlaIV
 hgiJII
 bsp1286
 bmyI
 banII

FIG.32P

		bsmAI
	rcaI	
	bsrBI nlaIII	
	aciI bspHI	
nlaIV		
3001	CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCCTGA	
	GCCTTGGGGA TAAACAAATA AAAAGATTTA TGTAAGTTTA TACATAGGCG AGTACTCTGT TATTGGGACT	
		mboII
	sspI	earI/ksp632I
3071	TAAATGCTTC AATAATATG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCCT	
	ATTTACGAAG TTATTATAAC TTTTTCCTTC TCATACTCAT AAGTTGTAAA GGCACAGCGG GAATAAGGGA	
		fnu4HI
	aciI	
		hphI
		sfaNI
3141	TTTTTGCGGC ATTTTGCCCTT CCTGTGTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG	
	AAAAACGCCG TAAACGGAA GGACAAAAC GAGTGGGTCT TTGCGACCAC TTTCATTTTC	
		hgiAI/aspHI
		bsp1286
	sau3AI	bsiHKAI
	mboI/ndeII[dam-]	
	dpnI[dam+] bmyI	
	dpnII[dam-]	
	mboII[dam-]	apaLI/snoI
	eco57I	alw44I/snoI
		maeIII
		bsrI
		nspBII
3201	ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA	
	TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT	
		sau3AI
		mboI/ndeII[dam-]
		dpnI[dam+]
		dpnII[dam-]
		bstYI/xhoII
		alwI[dam-]
		aciI

FIG.32T

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+]
dpnII[dam-]
alwI[dam-]
bstYI/xhoII
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

maeII
psp1406I
xmnI
asp700
mboII
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

hgiAI/aspHI
bsp1286 tru9I
bsiHKA I mseI
bmyI ahaIII/draI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

scrFI
nciI
mspI
hpaII
dsav
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

hinII/acyI
hgaI caulI
ahaII/bsaHI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

bciI mcrI fnu4HI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

rsal
csp6I bsrI
scaI hphI maeIII
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

dclI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

fokI
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTATAAGTTC
TCTAGGAAC CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTC AAG

FIG.32U

haeIII/palI
 eaeI
 cfrI
 fnu4HI
 aciI
 nlaIII
 fnu4HI
 bbvI
 nlaIII
 3441 ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT
 TACCGTACTG TCATTCTCTT AATACGTCAC GACGGTATTG GTACTCACTA TTGTGACGCC GGTGAATGA
 sau96I
 avaiI
 sau3AI asuI
 mboI/ndeII[dam-]
 dpnI[dam+]
 dpnII[dam-]
 pvuI/bspCI
 mcrI mnlI
 3511 TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGATCA TGTAACTCGC
 AGACTGTTGC TAGCCTCCTG GCTTCCTCGA TTGGCGGAAA AACGTGTTGT ACCCCCTAGT ACATTGAGCG
 mspI
 sau3AI nlaIV
 mboI/ndeII[dam-] aluI
 dpnI[dam+] hpaII
 dpnII[dam-] bsaWI
 3581 CTTGATCGTT GGAACCCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG
 GAACTAGCAA CCCTTGGCCT CGACTTACTT CGGTATGGTT TGCTGCTCGC ACTGTGGTGC TACGGTCGTC
 fnu4HI
 maeIII
 sfaNI
 bbvI

FIG. 32V

sau96I
 asuI
 nlaIV
 bsrI haeIII/palI mnlI
 3841 ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC
 TGACCCCGGT CTACCATTCG GGAGGGCATA GCATCAATAG ATGTGCTGCC CCTCAGTCCG
 eam1105I
 pleI
 hinfI
 foki
 3901 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG
 TTGATACCTA CTTGCTTTAT CTGTCTAGCG ACTCTATCCA CGGAGTGACT AATTCGTAAC
 ddeI
 sau3AI nlaIV
 mboI/ndeII[dam-] hgiCI tru9I
 dpnI[dam+] msel
 dpnII[dam-] banI mnlI
 maeIII
 3961 GTAACGTGTCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCATTTTAA
 CATTGACAGT CTGGTTCAAA TGAGTATATA TGAAATCTAA CTAAATTTTG AAGTAAAAAT
 tru9I msel
 msel
 ahaIII/draI msel
 rmaI sau3AI
 sau3AI hphI mboI/ndeII[dam-]
 mboI/ndeII[dam-]
 dpnI[dam+] dpnI[dam+]
 dpnII[dam-] dpnII[dam-]
 tru9I bstYI/xhoII alwI[dam-] nlaIII maeII
 msel alwI[dam-] bstYI/xhoII rcaI tru9I
 ahaIII/draI maeI mboII[dam-] bspHI msel
 4021 ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCACAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
 TAAATTTTCC TAGATCCACT TCTAGGAAA ACTATTAGAG TACTGGTTTT AGGGAATTGC ACTCAAAAGC

FIG.32X

FIG.32Y

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] sau3AI
dpnII[dam-] mboI/ndeII[dam-]
bstYI/xhoII dpnI[dam+]
sau3AI alwI[dam-] dpnII[dam-]
mboI/ndeII[dam-] alwI[dam-]
dpnI[dam+] mboII[dam-]
dpnII[dam-] bstYI/xhoII
4091 TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTC
AAGTGACTC GCAGTCTGGG GCATCTTTC TAGTTCCCTA GAAGAACTCT AGGAAAAAAA

          hgaI
          ddeI
          thaI
          fnuDII/mvnI
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI          fnu4HI
          hhaI/cfoI      bbvI
4151 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTGTG
GACGCGCATT AGACGACGAA CGTTTGTTCG ATGGTCGCCA CCAAACAAAC

          sau3AI
          mboI/ndeII[dam-]
          dpnI[dam+]
          dpnII[dam-]
          alwI[dam-]
          mspI
          hpaII          aluI
4211 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAACG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG
GGCCTAGTTC TCGATGGTTG AGAAAAAGGC TTCCATTGAC CGAAGTCGTC TCGCGTCTAT GGTATTATGAC
          bsrI          hinPI
          maeIII          eco57I          hhaI/cfoI

```

	rmaI	haeIII/palI							
	maeI	bslI	haeI	scfI	aciI	mnI			
4281	TCCTTCTAGT	GTAGCCGTAG	TTAGGCCACC	ACTTCAAGAA	CTCTGTAGCA	CCGCCTACAT	ACCTCGCTCT		
	AGGAAGATCA	CATCGGCATC	AATCCGGTGG	TGAAGTTCTT	GAGACATCGT	GGCGGATGTA	TGGAGCGAGA		
			fnu4HI		scrFI				
			bbvI		nciI				
		alwNI	bsrI	fnu4HI	mspI				
		bsrI	bbvI	bsrI	hpaII				
	maeIII				dsav	pleI			
					cauII	hinFI			
4351	GCTAATCCTG	TTACCAGTGG	CTGCTGCCAG	TGGCGATAAG	TCGTGTCTTA	CCGGGTTGA	CTCAAGACGA		
	CGATTAGGAC	AATGGTCACC	GACGACGGTC	ACCGCTATTTC	AGCACAGAAT	GGCCCAACCT	GAGTTCTGCT		
			nspBII		hgiAI/aspHI				
	mspI	fnu4HI			bsp1286				
	hpaII	bbvI	mcrI		bsiHKAII				
	bsaWI	hinPI	aciI		bmyI				
	maeIII	hhaI/cfoI			apaLI/snoI				
4421	TAGTTACCGG	ATAAGGCGCA	GCGGTCGGGC	TGAACGGGGG	GTTTCGTGCAC	ACAGCCCAGC	TGGAGCGAA		
	ATCAATGGCC	TATTCCGCGT	CGCCAGCCCC	ACTTGCCCCC	CAAGCACGTG	TGTCGGGTG	AACCTCGCTT		
		ddeI	scfI		hinPI				
					hhaI/cfoI				
					haeII				
4491	CGACCTACAC	CGAACTGAGA	TACCTACAGC	GTGAGCATTG	AGAAAGCGCC	ACGCTTCCC	AAGGAGAAA		
	GCTGGATGTG	GCTTGACTCT	ATGGATGTG	CACTCGTAAC	TCTTTCGCGG	TGCGAAGGGC	TTCCTCTTT		

FIG.32Z-1

4561 GCGGCACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGACGA GGGAGCTTC AGGGGAAC
CCGCTGTCC ATAGGCCATT CGCGGTCCCA GCCTGTCTCT CTCGGTGCT CCCTCGAAG TCCCCCTTG

scri

	dsav	bstNI	apyl[dcml]	mnlI	drdl	hgal	taql	sfaNI
4631	GCCTGGTATC	TTTATAGTCC	TGTCGGGTTT	CGCCACCTCT	GACTTGAGCG	TCGATTTTG	TGATGCTCGT	
	CGGACCATAG	AAATATCAGG	ACAGCCCCAA	GCGGTGGAGA	CTGAACTCGC	AGCTAAAAAC	ACTACGAGCA	

4701 CAGGGGGCG GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGC
 GTCCCCCGC CTCGGATACC TTTTTCGGT CGTTGCGCCG

FIG. 32Z-2

[illegible]

FIG. 32Z-3

```

thai
fnuDII/mvnI
bstUI
bsh1236I
hinPI
hhaI/cfoI
thai
fnuDII/mvnI
bstUI
tru9I aluI
bsh1236I haeIII/palI pvuII
bslI eaeI tfil asel/asnI/vspI
aciI cfrI hinfI msel nspBII bsrI aciI
4931 CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATCCAGC TGGCAGCACA GGTTTCCCGA CTGGAAGCG
GGCGCGCAA CCGGCTAAGT AATTAGGTG ACCGTGCTGT CCAAAGGGCT GACCTTTCGC

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
nlaIV bstNI
hgiCI apyI[dcn+]
bani bsaJI
4991 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC
CCGTCACCTCG CGTTGCGGTTA ATTACACTCA ATGGAGTGAG TAATCCGTGG GGTCCGAAAT GTGAAATACG

```

FIG.32Z-4

```

mspl      aciI      aluI      nlaIII
hpaII     bsrBI
5061 TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCACACA GGAACACAGCT ATGACCATGA
      AAGCCCGAGC ATACAACACA CCTTAACACT CGCCTATTGT TAAAGTGTGT CCTTGTGTCGA TACTGGTACT

```

```

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

```

>lengde: 5141

FIG.32Z-5

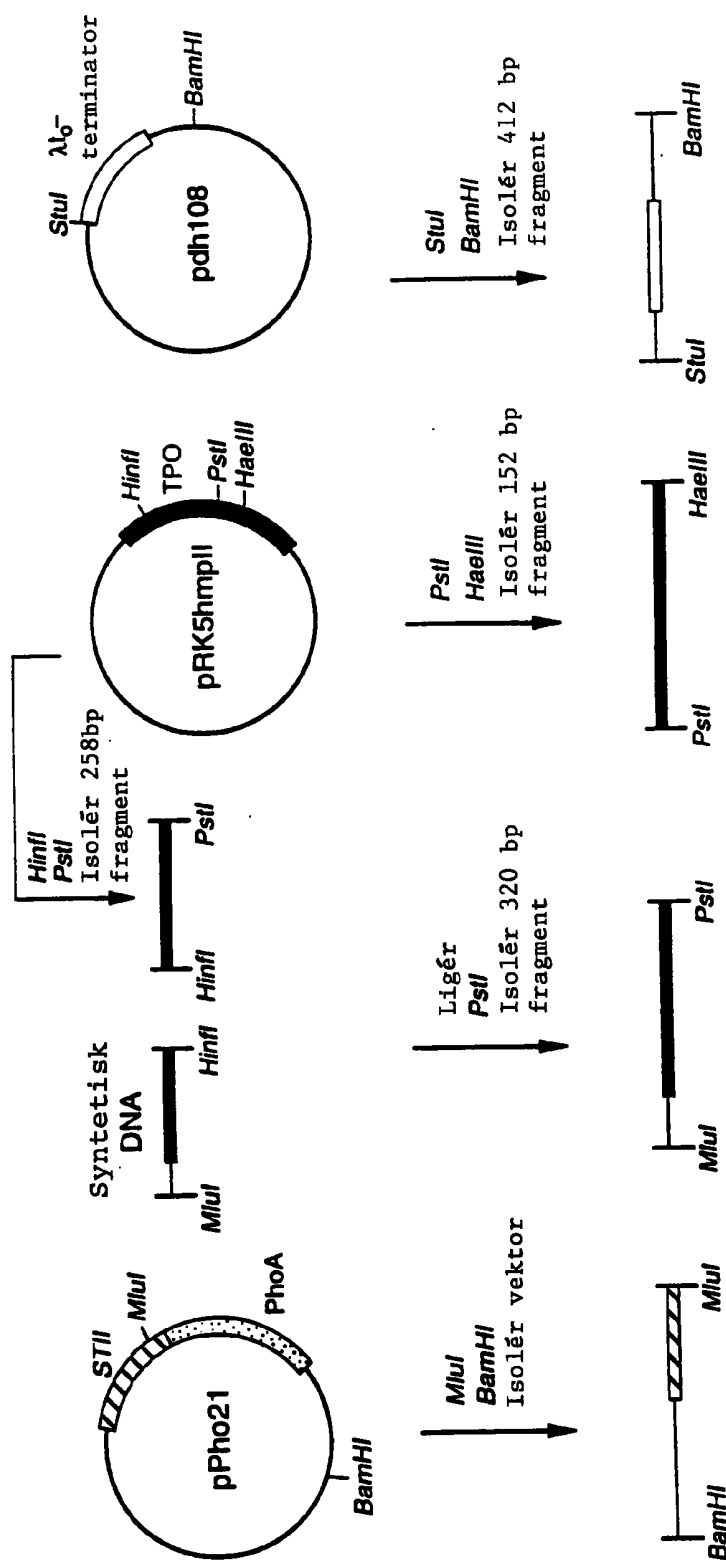


FIG.33A

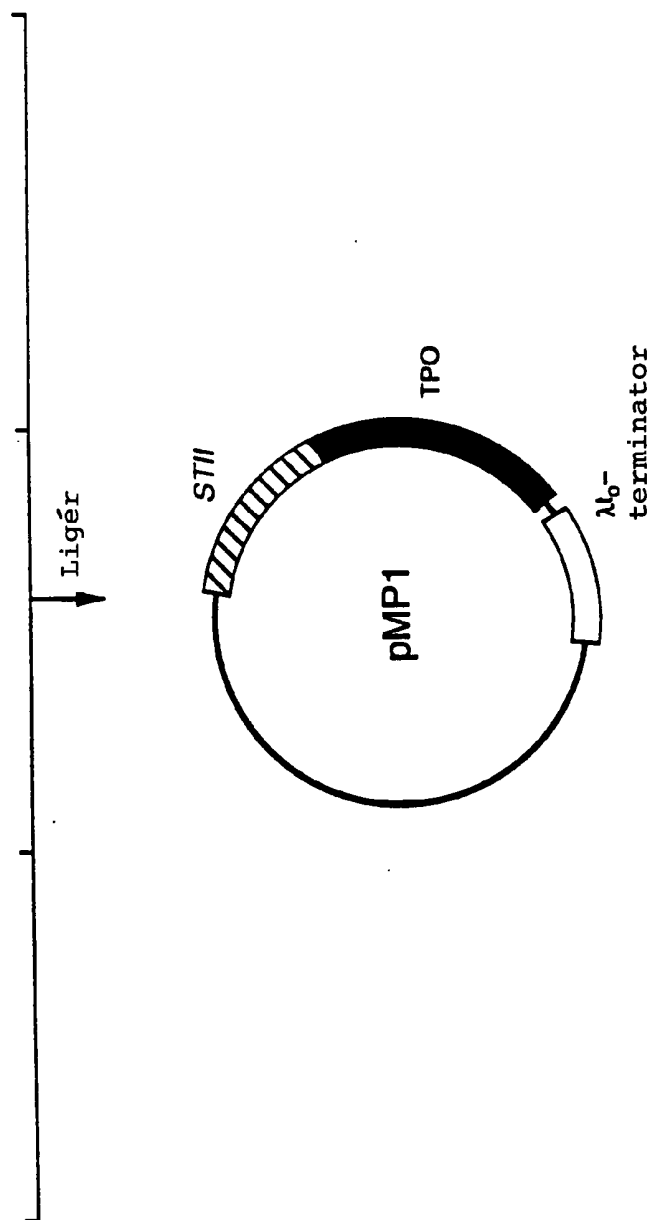


FIG.33B

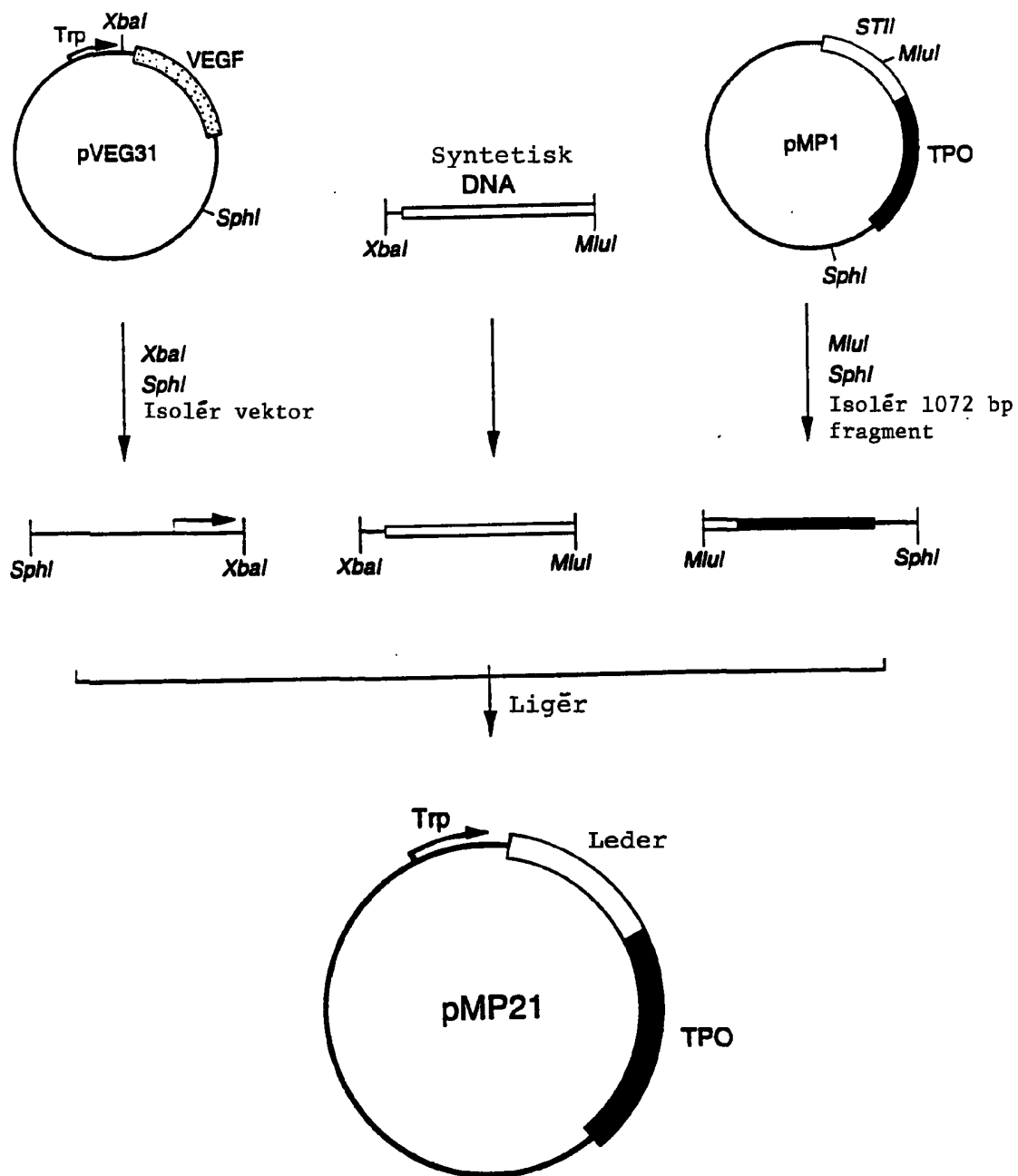


FIG.34

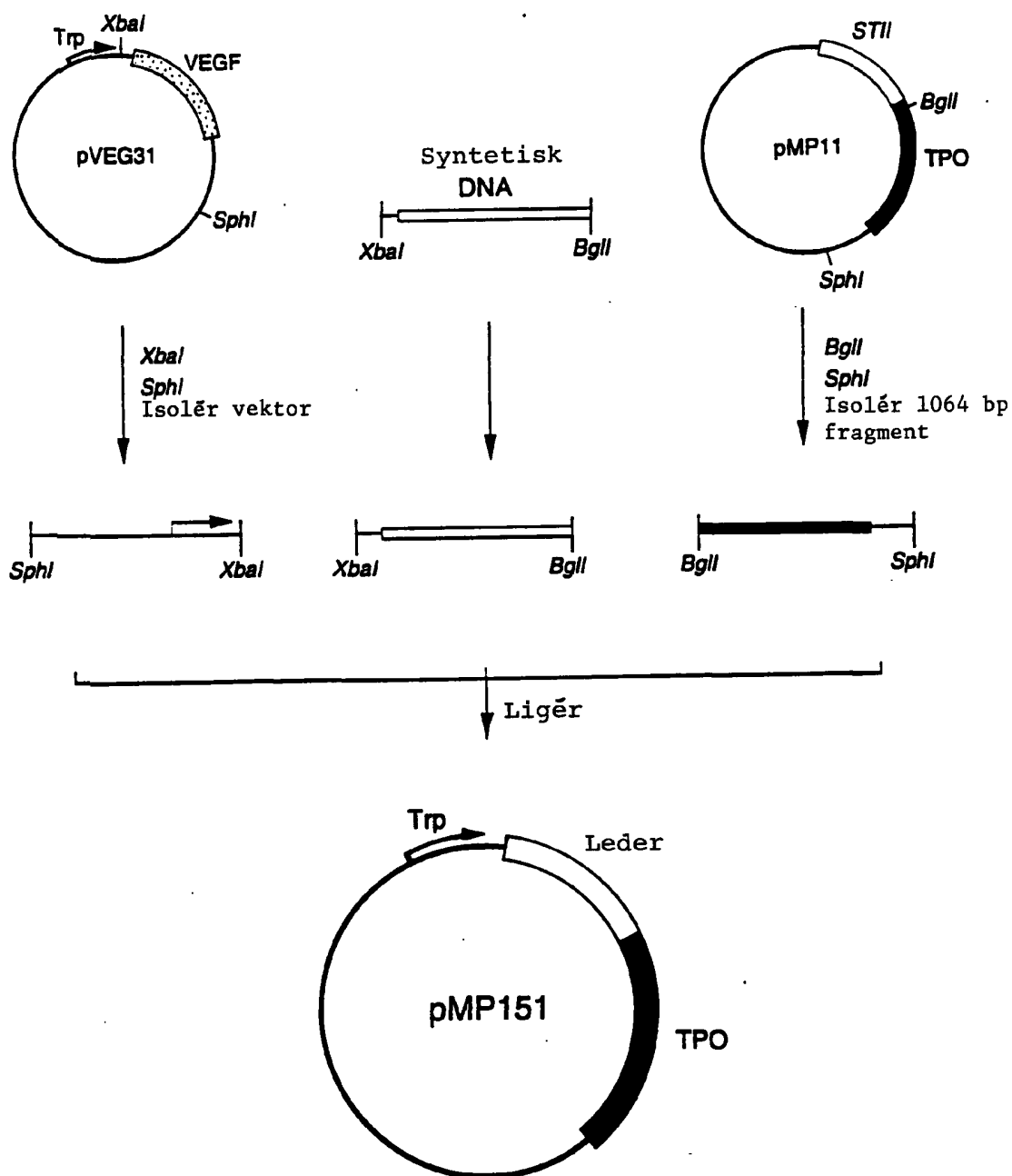


FIG.35

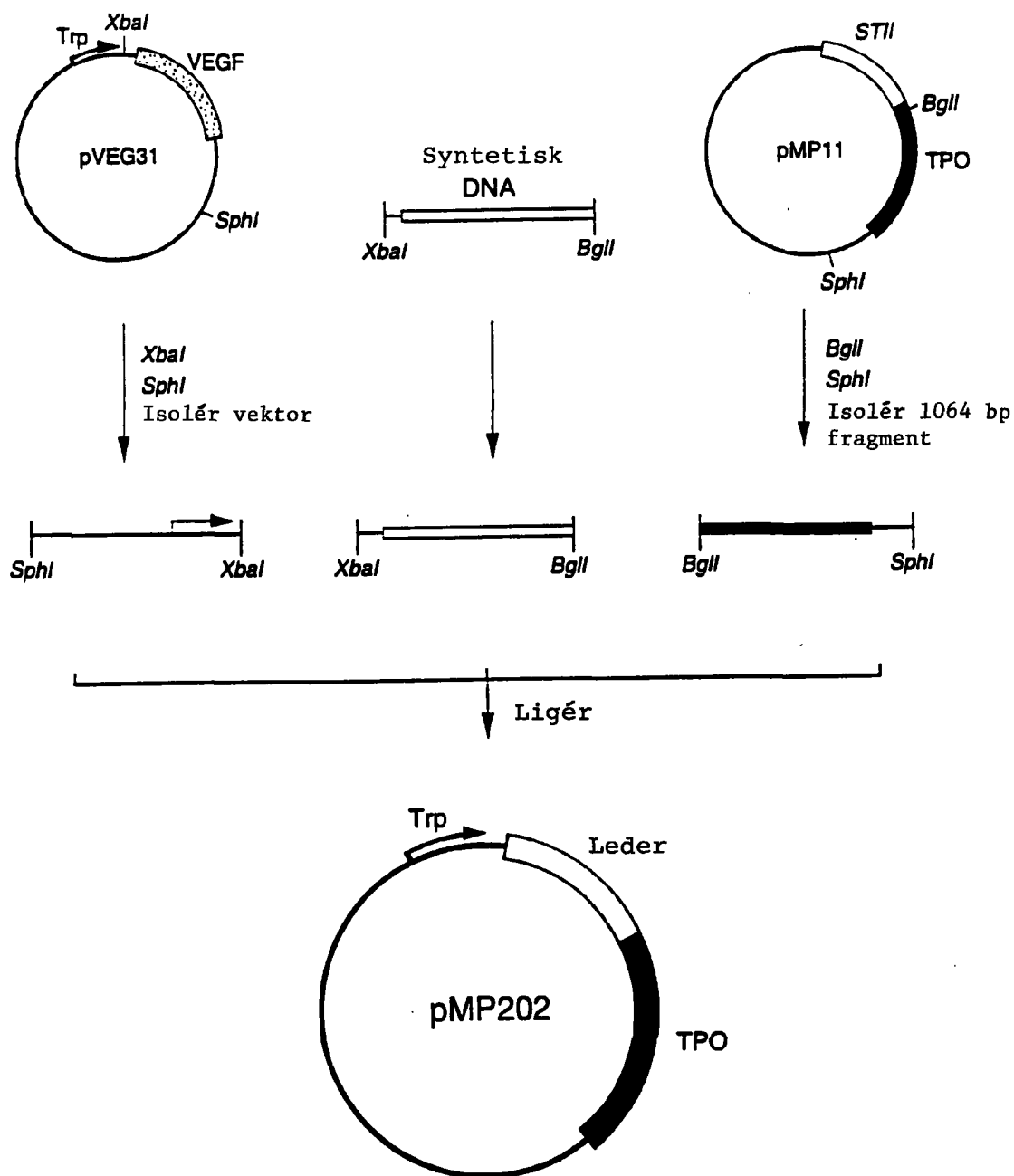


FIG.36

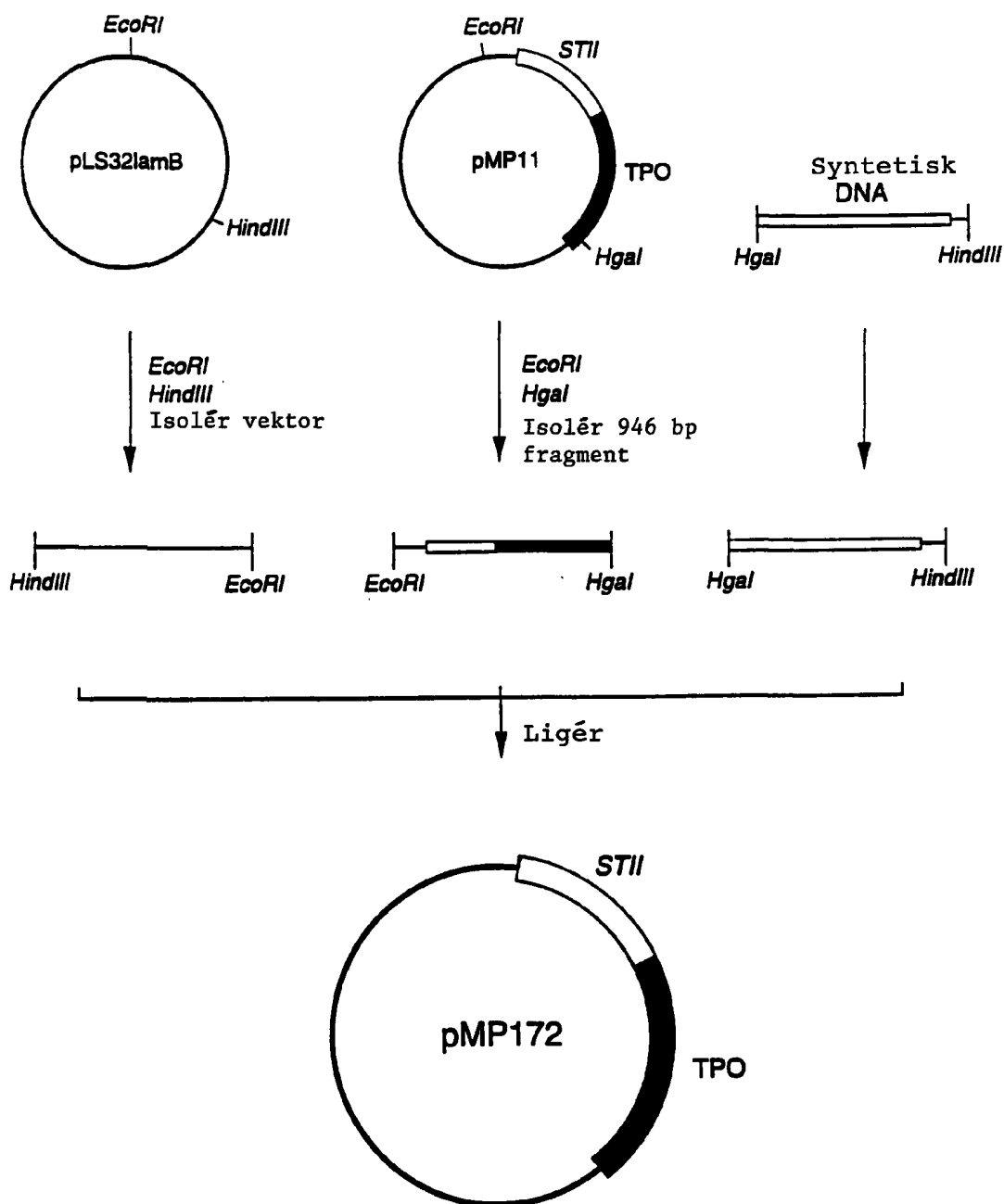


FIG.37

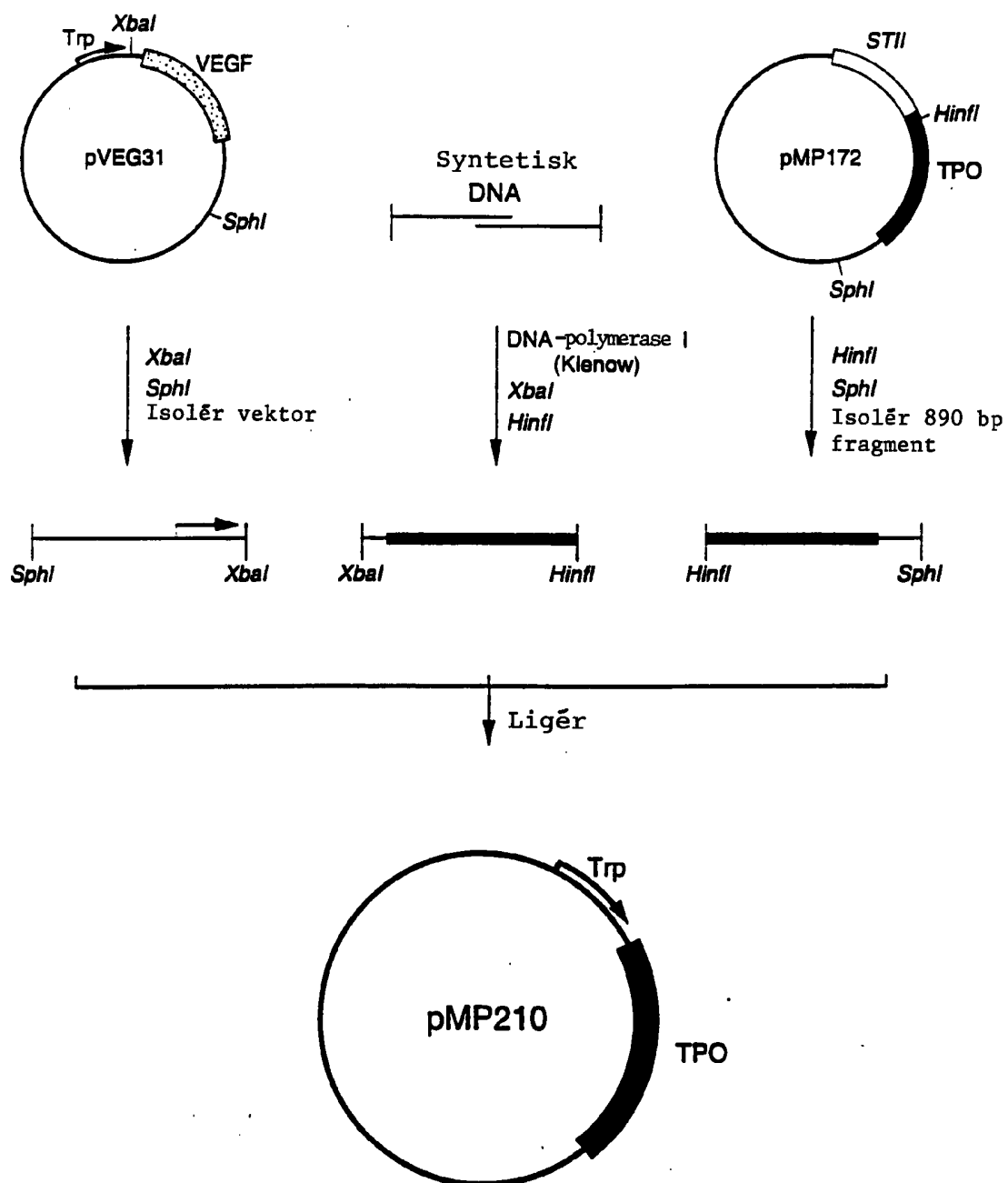


FIG.38

	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala
MP210-bank	ATG	TCN	CCN	GCN	CCN	CCN	GCN
MP210-1	ATG	TCT	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG
MP210-T8	ATG	TCG	CCT	GCT	CCA	CCT	GCT
MP210-21	ATG	TCG	CCA	GCG	CCA	CCA	GCC
MP210-24	ATG	TCC	CCA	GCC	CCA	CCC	GCA
MP210-25	ATG	TCG	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG

FIG.39

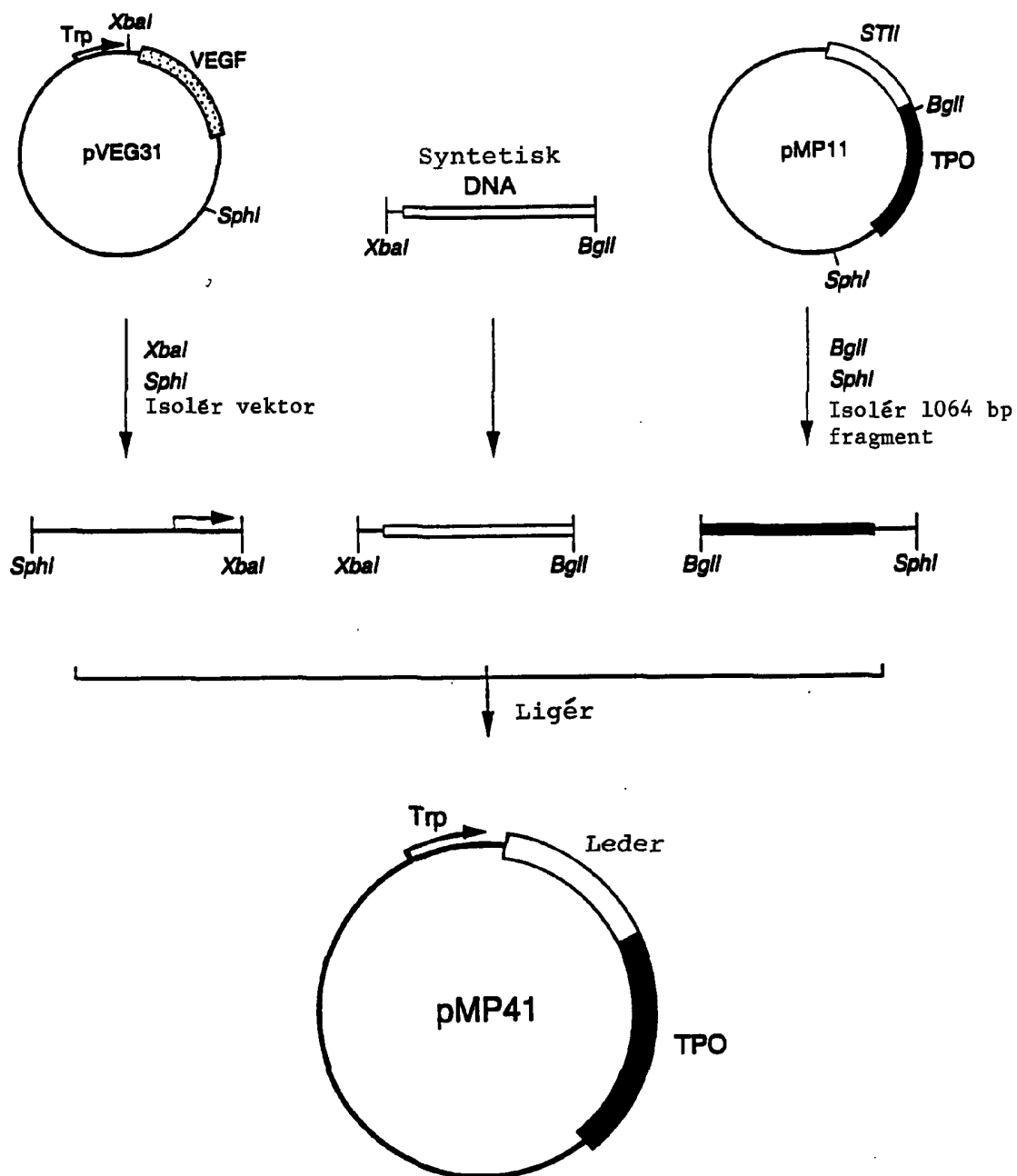


FIG.40

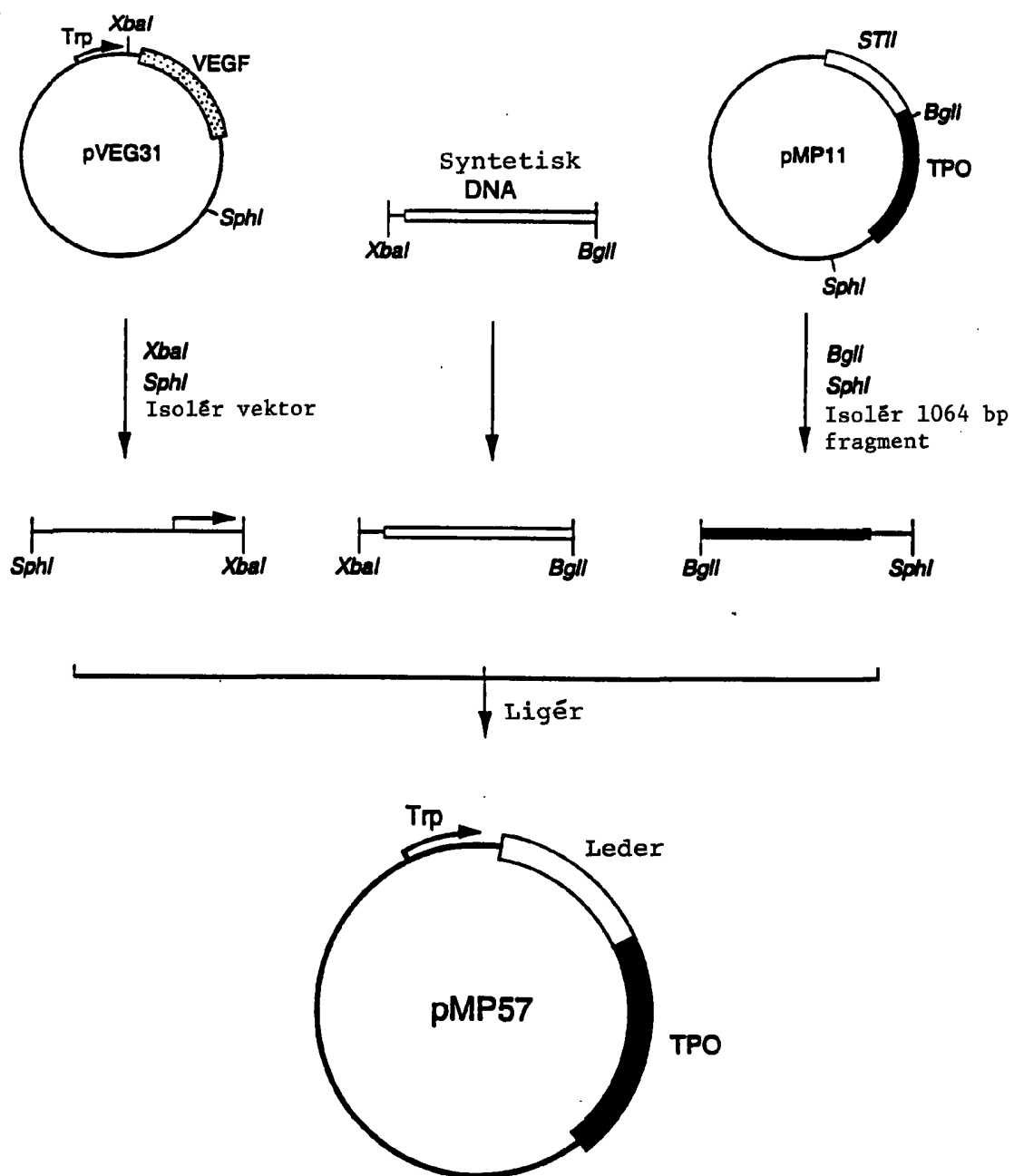


FIG.4 I

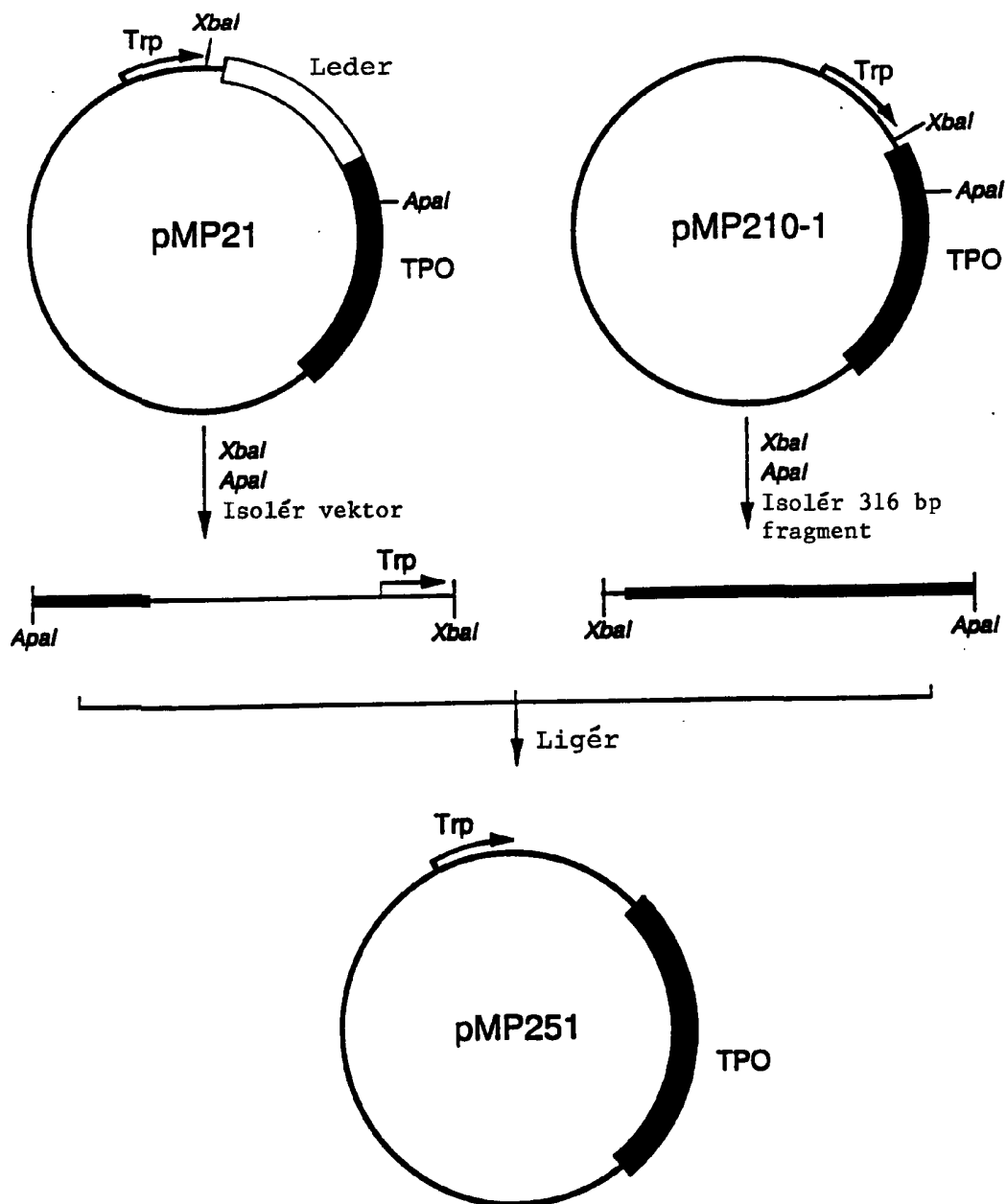


FIG.42