

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.09.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.09.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19947010**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/09594**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/23554**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1094

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12 A 61 K 38/18

C 12 N 15/11

C 07 K 14/475

C 07 K 16/22

G 01 N 33/68

G 01 N 33/577

C 12 Q 1/68

A 61 K 31/713

(71) Přihlašovatel:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG, Freiburg,
DE;**

(72) Původce:

Pahl Heike, Freiburg, DE;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití polypeptidu kódovaného genem PRV-1
nebo jeho fragmentu pro výrobu léku působícího
jako růstový faktor**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká nukleotidové sekvence kódující protein PRV-1, v podstatě obsahující sekvenci id. č. 1, a dále se týká použití genu PRV-1 nebo jeho fragmentu pro výrobu léku k léčení proliferativních onemocnění. Také se týká způsobu detekce genu PRV-1, mRNA kódované tímto genem a polypeptidu kódovaného tímto genem.

CZ 2002 - 1094 A3

27.03.02

PV1002-1094

23905

Použití polypeptidu kódovaného genem PRV-1 nebo jeho fragmentu pro výrobu léku působícího jako růstový faktor

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nukleotidové sekvence kódující gen PRV-1, rekombinantní DNA obsahující tuto nukleotidovou sekvenci, vektorů obsahujících tuto rekombinantní DNA a buněk, které jsou transformovány takovými vektory, a také se týká polypeptidu PRV-1. Především se vynález týká použití polypeptidu kódovaného genem PRV-1 nebo jeho fragmentu a/nebo použití nukleotidové sekvence genu PRV-1 pro výrobu léku působícího jako růstový faktor. Dále se vynález týká protilátek proti polypeptidu PRV-1, způsobu detekce polypeptidu PRV-1 a léčiv, která obsahují polypeptid PRV-1 nebo protilátky, které jsou namířeny proti polypeptidu PRV-1.

Dosavadní stav techniky

Polycythemia rubra vera (erytrémie), také nazývaná *polycythemia vera* nebo zkráceně *p. vera*, je maligní hematologické onemocnění, při kterém dochází ke zvýšené tvorbě erytroidů, granulocytů a megakaryocytů. Nemoc je klonálního původu a vzniká v důsledku mutace jediné hematopoetické prekursorové buňky. V Německu je incidence *p. vera* 4 až 6 na 1 milion obyvatel. Pokud zůstane nemoc neléčena, vede ke smrti během 18 měsíců. Léčení odebráním krve nebo užitím chemoterapie prodlužuje průměrnou dobu přežití na více než 13 let.

P. vera se diagnostikuje na základě klinických kritérií. Do klinického obrazu patří bolesti hlavy, pruritus, splenomegalie u dvou třetin pacientů, krvácení nebo trombózy, hypertenze u třetiny pacientů, dna, která je způsobena zvýšenou tvorbou kyseliny močové, a v některých případech také septické vředy. Nejdůležitějším laboratorním nálezem je zvýšení hodnot pro hemoglobin, hematokrit, počet erytrocytů a celkový objem erytrocytů, a také v mnoha případech neutrofilní granulocytóza nebo trombocytóza. Jelikož na jedné straně je většina kritérií značně difúzních, a na druhé straně, ne všichni pacienti splňují tato kritéria, je často velmi obtížné odlišit *p. vera* od jiných myeloproliferativních nemocí, jako je např. chronická granulocytární leukémie nebo esenciální trombocytóza, a tudíž potvrdit diagnózu. Molekulární příčiny *p. vera* jsou dosud naprosto neznámé. Jelikož však má *p. vera*, pokud není léčena, velmi těžký průběh, přesná diagnóza je velmi důležitá.

Podstata vynálezu

Cílem předkládaného vynálezu bylo zjistit molekulární příčinu onemocnění *polycythemia rubra vera* a nalézt vhodný způsob diagnostiky této nemoci.

Tohoto cíle bylo dosaženo tím, že byl izolován gen, jehož exprese je specificky asociována s *p. vera* a u kontrolních zdravých jedinců k ní nedochází. Tento gen byl pojmenován PRV-1 (*polycythemia rubra vera*).

Podobná nukleotidová sekvence byla popsána v mezinárodní patentové přihlášce WO 98/50552.

Jeden předmět předkládaného vynálezu se proto týká polynukleotidu, který kóduje gen PRV-1 a v podstatě obsahuje

sekvenci id. č. 1. Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu jsou jednořetězcové nebo dvojřetězcové DNA nebo RNA. Pokud jsou to RNA, pak je odborníkovi zřejmé, že nukleotidy "U" jsou zde přítomny místo nukleotidů "T". Termín "polynukleotid" v předkládaném popisu znamená nukleovou kyselinu, která obsahuje 15 nebo více nukleotidů.

Nukleotidová sekvence podle předkládaného vynálezu je znázorněna na obr. 1. Vynález se týká polynukleotidu, který odpovídá sekvenci uvedené na obr. 1 a také polynukleotidu, jehož nukleotidová sekvence vykazuje menší odlišnosti. Termínem sekvence vykazující "menší odlišnosti" se v popisu předkládaného vynálezu rozumí takové sekvence, ve kterých je změněno několik nukleotidů, výhodně ne více než 50 a zvláště výhodně ne více než 25 nukleotidů, přičemž funkce genu kódovaného nukleotidovou sekvencí není ovlivněna. Odborníkovi je známa skutečnost, že triplet bazí kódující aminokyselinu může být nahrazen jiným tripletem, který kóduje stejnou aminokyselinu. Navíc méně důležité úseky mohou být deletovány (odstraněny) a/nebo mutovány na sekvence vykazující menší odlišnosti.

V jednom specifickém provedení vynálezu polynukleotid obsahuje nukleotidy 36 až 1346 ze sekvence č. 1, což je kódující úsek genu PRV-1. V jiných provedeních vynálezu polynukleotid obsahuje nukleotidy 36 až 1262 nebo 36 až 1238 ze sekvence č. 1. Tento úsek je považován za úsek kódující aktivní úsek polypeptidu PRV-1. Nakonec polynukleotid podle předkládaného vynálezu může také obsahovat nukleotidy 39 až 1346, 39 až 1262 nebo 39 až 1238 ze sekvence č. 1, takže kodon, který kóduje počáteční methionin, chybí. Výhodným provedením vynálezu je polynukleotid, který obsahuje nukleotidy 99 až 1346, 99 až 1262 nebo 99 až 1238 ze sekvence

č. 1. Výsledkem je to, že kodony na 5'-konci kódující signální peptid polypeptidu PRV-1 nejsou přítomny.

Polynukleotid podle předkládaného vynálezu může být také fragmentem genu PRV-1. Zpravidla fragment obsahuje více než 100 nukleotidů, avšak výhodně více než 300 nukleotidů. Fragmenty mohou být užity jako primery nebo jako sondy, zejména pro PCR; v takovém případě se mohou fragmenty zkrátit, aby vyhovovaly požadovanému účelu. Primery jsou obvykle dlouhé 10 až 30 nukleotidů a sondy jsou obvykle dlouhé 15 až 50 nukleotidů.

Gen PRV-1 je endogenní gen, jehož exprese je však u zdravých jedinců omezena na několik málo orgánů. Normálně je exprimován hlavně v orgánech hematopoezy, tj. v kostní dřeni a fetálních játrech, a slabě je exprimován ve slezině, ale není exprimován v srdci, ve svalech pankreatu nebo ledvinách. U pacientů trpících p. vera je tento gen velmi silně nadměrně exprimován zejména v hematopoetických buňkách.

Gen PRV-1 kóduje protein, který má sekvenci uvedenou na obr. 2. Signální peptid, který je přítomen v proteinové sekvenci všech povrchových molekul a normálně je odstraněn v průběhu opracování proteinu v buňce ("processing"), je oddělen pomlčkou. Protein má sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 2.

Další aspekt předkládaného vynálezu se tudíž týká v podstatě čistého polypeptidu majícího sekvenci č. 2 nebo polypeptidu majícího sekvenci č. 2, ale postrádajícího signální peptid (tj. aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence č. 2). K dalším provedením vynálezu patří polypeptidy obsahující aminokyseliny 1 až 409, 22 až 409, 1 až 401 nebo 22 až 401 ze sekvence č. 2 (což jsou pravděpodobně aktivní úseky proteinu).

S ohledem na biologickou aktivitu je polypeptid podle předkládaného vynálezu výhodně glykosylován; nejvýhodněji je

N-glykosylovaný. Může být glykosylován na alespoň jedné z aminokyselin Asn-46, Asn-189 a Asn-382 polypeptidu PRV-1 (čísla aminokyselina odpovídají číslování v sekvenci č. 2).

Vynález se také týká fragmentů polypeptidu podle předkládaného vynálezu, které jsou N-glykosylovány. Fragmenty jsou dlouhé alespoň 50 aminokyselin, výhodně alespoň 100 aminokyselin a nejvýhodněji alespoň 150 aminokyselin. V jiném provedení vynálezu je polypeptid O-glykosylován.

Odborníkovi je zřejmé, že určité aminokyseliny mohou být nahrazeny jinými aminokyselinami, aniž by byla poškozena biologická aktivita proteinu. Takové modifikované formy polypeptidu podle předkládaného vynálezu jsou také předmětem předkládaného vynálezu (jde o varianty). Náhrady aminokyselin v tomto případě jsou takové náhrady, které nemají negativní účinek na biologickou aktivitu proteinu. Odborník snadno využije známá pravidla pro výběr aminokyselin, které se nahradí.

V závislosti na způsobu přípravy může polypeptid PRV-1 např. obsahovat také glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvu. Ta je pak navázána na aminokyseliny odpovídající aminokyselinám 407 až 409 v sekvenci id. č. 2. GPI kotva slouží k ukotvení proteinu prostřednictvím lipidů na vnější straně buněčné membrány. Často však bylo pozorováno, že i proteiny navázané prostřednictvím GPI (GPI-vázané proteiny) jsou uvolňovány do média, avšak pro tento jev nebylo dosud předloženo žádné vysvětlení. Tento jev se nazývá "odlupování" ("shedding"). Dosud nebylo objasněno, zda se jedná o specifický proces, tj. zda jsou proteiny odštěpovány z membrány řízeným způsobem pomocí enzymu, nebo zda se jedná o nespecifickou ztrátu kotvy.

Je tudíž velmi pravděpodobné, že PRV-1 se bude vyskytovat jak na buněčné membráně, tak i extracelulárně (mimo

buňku). Secernovaná forma, která není vázaná na membránu, je pravděpodobně důležitější pro působení peptidu jakožto růstového faktoru a růstového inhibitoru, neboť tato forma je schopná difúze a tak může zasahovat ostatní buňky.

Odborníkovi je zřejmé, že může ovlivnit připojení proteinu k buněčné membráně právě manipulací s C-koncovými aminokyselinami. To se zejména týká přípravy definovaných konstruktů DNA, které jsou určeny pro expresi polypeptidu PRV-1 nebo jeho fragmentů. Kodony kódující tyto aminokyseliny mohou být mutovány nebo deletovány.

Gen kóduje povrchový receptor z rodiny uPAR/Ly6. Tato receptorová rodina přenáší mitogenní signály, tj. signály stimulující dělení buněk. Předpokládá se proto, že nadměrná exprese genu PRV-1, kromě jiného, v buňkách kostní dřeně u pacientů s p. vera, přispívá k nadměrné proliferaci (hyperproliferaci) těchto buněk.

Bylo zjištěno, že PRV-1 není exprimován na granulocytech zdravých jedinců nebo u pacientů trpících jiným myeloproliferativním onemocněním jako je např. chronická granulocytární leukémie, akutní granulocytární leukémie, esenciální trombocytóza nebo sekundární erytrocytóza.

Aby bylo možné polypeptid kódovaný genem PRV-1 použít pro analytické a detekční metody, je pohotově připravován pomocí rekombinantní DNA, přičemž výhodně rekombinantní DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci id. č. 1 nebo alespoň kódující úsek genu PRV-1, tzn. nukleotidy 36 až 1346 ze sekvence id. č. 1, nebo v jiném případě alespoň nukleotidy 39 až 1262 nebo 39 až 1238, funkčně spojené s promotorem. Avšak rekombinantní DNA může také obsahovat jen fragment sekvence č. 1.

Vynález se dále týká vektoru obsahujícího rekombinantní DNA pro polypeptid PRV-1, nebo jeho fragment,

a hostitelské buňky, která je transfekovaná nebo transformovaná tímto vektorem. Hostitelské buňky jsou prokaryotické buňky, jako např. bakterie jako je *E. coli*. Avšak v takovém případě polypeptidy, které jsou exprimovány, nejsou glykosylovány. Výhodné jsou proto eukaryotické hostitelské buňky, které jsou schopny posttranslačně glykosylovat exprimovaný protein a případně ho modifikovat i jiným způsobem. K příkladům eukaryotických hostitelských buněk patří hmyzí buňky, jako např. Sf9 buňky, pro expresi, ke které dochází po infekci rekombinantními bakuloviry, a savčí buňky, jako např. 293 buňky, COS buňky, CHO buňky a HeLa buňky. Tyto příklady však rozsah vynálezu nijak neomezují. Jako hostitelské buňky mohou být využity i kvasinkové buňky. Odborníkovi je zřejmé, že glykosylační profily se liší v závislosti na typu hostitelských buněk. Tudiž biologická aktivita výsledného produktu je také různá. Zvláště výhodné jsou hostitelské buňky, které glykosylují exprimovaný produkt takovým způsobem, že je zachována biologická aktivita proteinu.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu přípravy polypeptidu podle předkládaného vynálezu. Tento způsob spočívá v tom, že DNA kódující polypeptid podle vynálezu se exprimuje v hostitelské buňce. Kultivační médium nebo buňky se pak užijí k následné izolaci polypeptidu v závislosti na tom, zda je exprimovaný polypeptid secernován hostitelskými buňkami do kultivačního média nebo zda zůstává v buňce. Pak se polypeptid podle předkládaného vynálezu koncentruje a/nebo purifikuje, a sice postupy, které jsou odborníkovi známy, např. chromatografickými metodami. Metody purifikace byly popsány např. v publikaci Scopes, R., Protein Purification: Principles and Practice (3rd edition), Springer Verlag (1994). Jedním výhodným provedením vynálezu je způsob, který obsahuje krok, kdy je glykosylovaný polypeptid

koncentrován a/nebo purifikován. Tento krok může proběhnout před tím, než je polypeptid podle předkládaného v podstatě purifikován nebo po té, co již byl v podstatě purifikován. V tomto druhém případě je glykosylovaná část purifikovaného polypeptidu separována a izolována. V nejvýhodnějším provedení způsobu podle předkládaného vynálezu se specificky izoluje N-glykosylovaný polypeptid. V jiném provedení způsobu podle vynálezu se izoluje polypeptid, který je glykosylovaný na alespoň jedné z aminokyselin Asn-46, Asn-189 a Asn-382 ze sekvence č. 2.

Polypeptid PRV-1, který byl izolován z granulocytů nebo připraven rekombinantním způsobem může být využit jak pro diagnostiku *polycythemia vera* tak i při léčení této nemoci. Jednou z terapeutických možností je tzv. "antisense" terapie. Při tomto léčení se využívá molekula "antisense" RNA, což je RNA, která je komplementární k PRV RNA. Jelikož PRV-1 RNA má na svém začátku sekvenci 5'AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCC-3' (sekvence id. č. 3), příslušná antisense RNA namířená proti této sekvenci by měla následující nukleotidovou sekvenci: 5'-GGCTGGTAATCTCTTTCTGCTTTT-3' (sekvence id. č. 4). Tato antisense RNA se vloží do vektoru a vnese do buněk s *p. vera*. Tato RNA se např. vnese transfekcí, prostřednictvím vektoru pro transfekci, kdy vektor je výhodně konfigurován tak, aby vstupoval specificky do buněk s *p. vera*. Exprese antisense RNA vede k tomu, že PRV-1 mRNA již není nadále translatována do polypeptidu. Buňky, které byly léčeny tímto způsobem, pak nevytvářejí protein PRV1.

Vynález se také týká způsobu detekce *p. vera*, který spočívá v tom, že se detekuje polypeptid PRV-1 nebo jeho epitop, a stanoví se rozsah jeho exprese.

Nadměrná exprese ("overexpression") tohoto receptoru na zralých buňkách mimo kostní dřeň, např. na granulocytech,

je silnou indikací přítomnosti nemoci p. vera. Tato nadměrná exprese se pohotově detekuje pomocí imunotestu s využitím protilátek, které jsou namířeny proti PRV-1 receptoru. K vhodným testovacím metodám patří odborníkům známé varianty imunotestů, kde se užívají protilátky specifické pro polypeptid PRV-1 společně s dalšími značenými protilátkami, které jsou buďto imobilizované nebo jsou v roztoku.

Značení se provádí metodami, které jsou odborníkům známy, např. pomocí radioaktivních izotopů, s využitím fluorescence nebo luminescence, užitím enzymů, pomocí reakcí vytvářejících berevný produkt nebo užitím jiných skupin, které jsou vhodné pro detekci. Tyto varianty jsou odborníkům dobře známy a není třeba je zde podrobně vysvětlovat. Zvláště výhodný je pro potřeby podle předkládaného vynálezu test ELISA.

Protilátky, které jsou potřebné pro specifickou detekci PRV-1 receptoru mohou být připraveny způsoby, které jsou odborníkům známy. Jak monoklonální tak polyklonální protilátky jsou vhodné při realizaci předkládaného vynálezu, přičemž výhodnější jsou monoklonální protilátky.

Pro přípravu protilátek mohou být užity také peptidy získané z proteinu. Podle předkládaného vynálezu bylo dosaženo úspěchu s peptidy majících sekvenci:

a) KVSDLPRQWTPKN (aminokyseliny 34 až 46) [sekvence id. č. 5], a

b) SAREKRDVQPPASQH (aminokyseliny 391 až 405) [sekvence id. č. 6] .

Polyklonální protilátky se normálně připravují imunizací vhodného příjemce (např. králíka) polypeptidem PRV-1, který je v případě potřeby navázán imunologický nosič (adjuvans), a který vyvolá imunitní reakci. Monoklonální protilátky se připravují technikami hybridomů, které jsou

odborníkům známy. Protilátky mohou být purifikovány pomocí afinitní purifikace. Příprava a purifikace protilátek byly popsány v odborných publikacích, např. v "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Navíc takové polyklonální nebo monoklonální protilátky, které jsou namířeny proti PRV-1, mohou být využity i pro léčení nemoci.

V jiném provedení vynálezu může být PRV-1 receptor detekován pomocí metody RT-PCR. Při této metodě se nejdříve izoluje RNA z buněk nadměrně exprimujících PRV-1, což jsou zpravidla granulocyty. Reverzní transkripce se provádí způsobem, který je odborníkům znám, a sice užitím tzv. RT primeru. RT primer je výhodně primer, který má následující nukleotidovou sekvenci (sekvence id. č. 7):

ATTAGGTTATGAGGTCAGAGGGAGGTT.

Tímto způsobem se PRV-1 RNA specificky převede na DNA. Tato DNA se pak amplifikuje v reakci PCR způsobem, který je odborníkům znám. Pro amplifikační cykly se výhodně použijí následující primery, a sice jako "sense primer" (sekvence id. č. 8):

GCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGG.

A jako "antisense primer" (sekvence id. č. 9):

GAATCGTGGGGTAATAGAGTTAGCAGG.

Odborník je schopen okamžitě a snadno užít sekvenci podle předkládaného vynálezu k tomu, aby našel sekvence pro jiné primery, které budou také vhodné k realizaci vynálezu.

Jelikož se jako výchozí materiál v tomto postupu užívá RNA, PCR signál je pozitivní pouze tehdy, když je gen PRV-1 exprimován. Jak bylo již vysvětleno výše, to je pouze v případě, že pacient trpí p. vera. PRV není exprimován

v granulocytech zdravých jedinců. Tudíž nepřítomnost RT-PCR signálu nepřítomnost *p. vera*. Metoda RT-PCR se výhodně provádí užitím TaqMan® technologie. Kvantifikace vyžaduje užit k primerům navíc ještě sondy. Výhodná sekvence sondy je následující (sekvence id. č. 10:)

5'-TTCTTGTTGAACACACCAGACAAATCGG-3'

Kvantitativní RT-PCR pro detekci transkriptu PRV-1 je proto také předmětem předkládaného vynálezu.

Jinou alternativou diagnostiky *p. vera* je využití metody přenosu a hybridizace ("blotting"), výhodně metody northern přenosu ("Northern blotting"). Při užití této metody se RNA izoluje z granulocytů a pak se vyšetřuje na expresi PRV-1 užitím přenosu, např. Northern přenosu. cDNA sekvence mající sekvenci id. č. 1 nebo segment z této sekvence se může užit jako sonda. K hybridizaci se sondou dojde pouze v takovém případě, kdy granulocyty pocházely z pacienta trpícího *p. vera*, neboť jen v takovém případě je v granulocytech nějaké exprese. Absence hybridizace indikuje, že jedinec, ze kterého pocházely testované granulocyty, nemá nemoc *p. vera*.

Pro hybridizaci Northern blotů je možné užit také fragmenty genu. Takové fragmenty jsou normálně delší než 100 bazí, výhodně jsou delší než 300 bazí. Alternativně se mohou připravit různé fragmenty genu, které se užijí jako sondy pro Northern blot, naštěpením genu pomocí restričních endonukleáz. Pokud fragmenty pocházejí z cDNA, pak jsou ve formě dvojřetězce a pro hybridizaci musí být separovány na jednotlivé řetězce. K vhodným příkladům patří fragment BamHI-PstI obsahující páry bazí 420 až 831, nebo fragment PstI-PstI obsahující páry bazí 831 až 1900.

PRV-1 mRNA, a tudíž i exprese PRV-1, se může detekovat v RT-PCR nejdříve reverzní transkripcí mRNA a pak amplifikací

cDNA, a amplifikovanou DNA pak detekovat sondou metodou hybridizace.

V případě pozitivní diagnózy je třeba nemoc léčit, neboť jinak vede během velmi krátké doby k úmrtí. Pro léčení je možné využít specifické protilátky, které jsou namířeny proti PRV-1, na které může být v případě potřeby navázána cytotoxická složka.

Vynález se dále týká léku, který kromě obvyklých excipientů obsahuje protilátky, které jsou namířeny proti receptoru PRV-1.

Jelikož je PRV-1 receptor nadměrně exprimován při *p. vera*, mnohé protilátky se naváží na povrch postižených granulocytů, když se dostanou do kontaktu s protilátkou anti-PRV-1. Navázání mnoha protilátek na tyto buňky stimuluje imunologické buňky k likvidaci těchto granulocytů. Takovým způsobem je tedy možné specificky eliminovat *p. vera* buňky.

Překvapivě bylo také zjištěno, že polypeptid PRV-1 vykazuje hematopoetickou aktivitu. Polypeptid PRV-1 je schopen stimulovat určité hematopoetické prekursorové buňky k vytváření erytroidních kolonií. Je to zejména N-glykosylovaný polypeptid PRV-1, který projevuje tuto funkci. Polypeptidy podle předkládaného vynálezu, které jsou proto výhodné, jsou tudíž N-glykosylované polypeptidy PRV-1 jejich fragmenty, které vykazují aktivitu růstového faktoru.

Další aspekt předkládaného vynálezu se tudíž týká léku, který, kromě farmaceuticky tolerovaných excipientů, obsahuje polypeptid PRV-1 nebo jeho biologicky aktivní fragment. Polypeptid PRV-1 je výhodně glykosylovaný polypeptid PRV-1, výhodněji N-glykosylovaný polypeptid PRV-1 nebo jeho biologicky aktivní fragment. Vynález se týká také léčiv, která obsahují alespoň jeden polynukleotid podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález se dále týká použití polypeptidu PRV-1, nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky aktivní varianty jakožto růstového faktoru *in vivo* a *ex vivo*. Polypeptid PRV-1, nebo jeho biologicky aktivní fragment nebo jeho biologicky aktivní varianta, může být využit při léčení všech typů pancytopenií a pancytopatií kostní dřeně i krevního oběhu (změna buněčných složek periferní krve a kostní dřeně). Polypeptidy podle předkládaného vynálezu se využijí např. při léčení anemií v případě selhání ledvin, chemoterapie nebo celotělového ozařování, při léčení neutropenií trombocytopenií v průběhu chemoterapie nebo celotělového ozařování, pro *ex vivo* ošetření buněk periferní krve nebo kmenových buněk kostní dřeně pro jejich expanzi (multiplikaci) a retransfúzi pacientovi, a také při léčení sepse, syndromu systémové zánětlivé reakce (SIRS) nebo lokálních zánětlivých reakcí. Polypeptidy podle předkládaného vynálezu, nebo léčiva, která je obsahují, mohou být podávány různými způsoby. K vhodným způsobům podávání patří např. intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraperitoneální, perorální, transdermální a transmukozální.

Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu mohou být použity také při léčení pancytopenií a pancytopatií. V takovém případě je cílem exprimovat polypeptid PRV-1 nebo jeho funkční fragment v buňkách postiženého pacienta. V této souvislosti se především a nejčastěji užívají metody genové terapie. Buňky mohou být izolovány z pacienta a transfekovány polynukleotidem podle předkládaného vynálezu (*ex vivo* manipulace), a pak zase vráceny pacientovi. Lze si také představit metodu, kdy polynukleotidy podle předkládaného vynálezu budou vneseny do cílových buněk prostřednictvím virového přenosu. Expres vložených nukleových kyselin pak povede k hematopoetické aktivitě.

Překvapivě bylo také zjištěno, že při vyšších koncentracích polypeptid PRV-1 má inhibiční účinek na růst buněk. Tak např. bylo pozorováno, že přidání zvýšeného množství proteinu PRV-1 skutečně úplně zastavilo vytváření kolonií erytroidů a granulocytů/monocytů. Tento účinek připomíná působení interferonu- α , který se, kromě jiného, terapeuticky využívá při léčení chronické myeloidní leukémie (CML) a *p. vera*. Endogenní inhibiční látka má velkou výhodu ve srovnání s chemickými cytostatiky, jako je např. hydroxymočovina, která byla užívána, dokud nebyl dostupný interferon- α , a do jisté míry se užívá dodnes. Nevýhodou interferonu- α je to, že tato účinná látka má velmi silné vedlejší účinky. Pacienti se cítí, jako-by měli silnou chřipku. Předkládaný vynález tak poskytuje látku inhibující hematopoezu, jejíž inhibiční účinek je koncentračně závislý.

Další aspekt předkládaného vynálezu se proto týká použití polypeptidu PRV-1, jak je popsán v této přihlášce, pro inhibici růstu buněk, zejména použití jakožto cytostatika. Výhodně se polypeptid podle vynálezu užívá pro inhibici růstu hematopoetických buněk. Vynález se také týká použití polypeptidu podle předkládaného vynálezu pro výrobu léků k léčení proliferativních nemocí. K těmto nemocem patří zejména myeloproliferativní nemoci, *p. vera*, esenciální trombocytémie, myelofibróza, CML a také leukémie, lymfomy a solidní nádory.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká použití polynukleotidu, jak je popsán v této přihlášce, jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky aktivní varianty, pro inhibici růstu buněk. Polynukleotid může být vložen do vhodného vektoru a transfekován do vhodné cílové buňky. Po té, co byl polypeptid PRV-1, nebo jeho biologicky aktivní fragment nebo jeho biologicky aktivní varianta,

exprimován ve vhodné koncentraci, dostaví se účinek inhibující růst. Stejně tak může být polynukleotid vložen do virového vektoru, kterým jsou pak infikovány vhodné cílové buňky, což vede k expresi PRV-1. Vynález se také týká použití polynukleotidu podle vynálezu pro výrobu léku léků k léčení proliferativních nemocí, jako jsou např. myeloproliferativní nemoci, p. vera, esenciální trombocytémie, myelofibróza, CML a také leukémie, lymfomy a solidní nádory.

Vynález se dále týká soupravy (kitu) pro detekci buďto polycythemia vera nebo onemocnění hematopoetického systému. Tyto soupravy podle předkládaného vynálezu obsahují polynukleotid podle vynálezu a/nebo polypeptid podle vynálezu a/nebo jednu nebo více protilátek podle vynálezu. Tyto soupravy navíc mohou obsahovat nádobu nebo přípravky vhodné pro provádění detekčních reakcí. K příkladům takových přípravků patří pufrovací roztoky, reagentie na blokování membrán, hybridizační roztoky, sekundární protilátky, roztoky substrátu pro detekční reakce atd. Souprava podle vynálezu se výhodně užívá k provádění reakcí typu PCR, RT-PCR, Northern přenos (Northern blot), Southern přenos (Southern blot), Western přenos (Western blot), ELISA, RIA nebo podobných reakcí.

Následující příklady slouží k podrobnějšímu vysvětlení předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Charakterizace genu PRV

Pro charakterizaci genu PRV byly provedeny následující experimenty:

Pro izolaci granulocytů z uskladněné krve nebo z čerstvé krve odebrané pacientům s p. vera byl užit následující postup:

- ke krvi byl přidán shodný objem 3% roztoku dextransu v 0,9% NaCl a směs byla ponechána stát při teplotě místnosti (RT) po 20 minut,

- směs se rozdělila na dvě fáze. Horní, slabě zbarvená fáze byla odstraněna centrifugací po 10 minut při 1800 g a při teplotě místnosti,

- supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován ve shodném objemu 0,9% NaCl,

- v každém případě bylo 35 ml buněk v NaCl navrstveno na 15 ml Ficoll-Hypaque,

- buňky na vrstvě Ficoll-Hypaque pak byly centrifugovány po 60 minut při 1800 g a při teplotě místnosti bez brždění,

- vzniklo tak rozvrstvení na buněčný pelet a dvě vrstvy s mezifází,

- vrstvy a mezifáze byly odsáty buněčný pelet byl resuspendován po 30 vteřin v 10 ml ledového 0,2% NaCl, a 10 ml ledového 1,6% NaCl bylo přidáno ihned po 30 vteřinách,

- buňky byly centrifugovány po 10 minut při 1800 g a při teplotě místnosti,

- pak byly promyty jednou v 10 ml PBS a opět centrifugovány,

- buněčný pelet obsahoval z 95 až 99 % čisté granulocyty,

- RNA byla izolována z těchto buněk standardními metodami,

- 10 mg této RNA bylo pak vyšetřeno na expresi PRV-1 metodou Northern přenosu. Celá cDNA sekvence uvedená zde jako sekvence id. č. 1 byla užita jako sonda.

Tento experiment byl proveden se vzorky 39 pacientů s *p. vera* a 29 kontrolními vzorky z uskladněné krve. Bylo zjištěno, že sonda PRV-1 hybridizovala silně v případě vzorků z pacientů s *p. vera*. Žádná hybridizace nebyla pozorována u kontrolních vzorků ze zdravých jedinců.

Příklad 2

PRV-1 projevuje aktivitu růstového faktoru

Z pregnantních myší byla 13. Den po fertilizaci vyjmuta embrya. Z nich byla odebrána fetální játra. Buňky v nich obsažené byly obarveny pomocí protilátek a pomocí chromatografie na koloně obohaceny o buňky konkrétního buněčného typu a naopak zbaveny buněk jiných typů. Tak byla získána směs obohacená o určité hematopoetické prekurzorové buňky (erytroidní progenitorová/prekurzorová buňka vytvářející kolonie, CFU-E). Takže zatímco CFU-E představují přibližně 2 % fetálních jater, obohacená směs obsahovala 30 až 40 % buněk CFU-E.

Buňky CFU-E byly transfekovány pomocí retroviru. Sbalovací buněčná linie, označovaná 293-T, byla transfekována 48 předem. Buňky 293-T jsou buňky zavedené buněčné linie humánních embryonálních ledvin. Buňky 293-T jsou stabilně transfekovány několika geny z retroviru. Jestliže se nyní tyto

buňky 293-T transfekují dvěma plasmidy, označenými pOS a pKAT, pak buňky 293-T produkují retrovirus, který je schopen infikovat buňky myších fetálních jater. Když jsou buňky 293-T transfekovány prázdnými vektory pOS a pKAT, je produkován retrovirus divokého typu, který exprimuje pouze retrovirové proteiny. Na druhé straně, klonování humánního genu, jako je např. PRV-1, do vektoru pOS vede po infekci buňky retrovirem k produkci retroviru, který exprimuje tento protein. Buňky 293-T secernují retrovirus do kultivačního média.

Po dvou dnech se buněčné kultivační médium z transfekovaných buněk 293-T obsahující retrovirus sklídí a přefiltruje přes 0,45 μ m filtr. Pro transfekci fetálních jaterních buněk se tyto buňky smíchají s přefiltrovaným buněčným kultivačním médiem obsahujícím retrovirus, a centrifugují po 2 hodiny při 1800 rpm a 20 °C v přítomnosti přidaného činidla Polybren. Transfekované fetální jaterní buňky se pak kultivují v médiu (Methocult, od firmy Cell Systems) obsahujícím, kromě obvyklých solí a aminokyselin, fetální telecí sérum, 0,0001 až 0,4 IU erytropoetinu (EPO)/ml a methylcelulózu (0,8%). Buňky CFU-E vyžadují EPO, aby vytvářely hematopoetické kolonie. Methylcelulóza ztuhuje médium do gelovité podoby, a tím fixuje jednotlivé buňky v tomto gelu, takže se na rozdíl od tekutého média nemohou pohybovat. Lze tudíž pozorovat, zda se z jednotlivých buněk vytvářejí nebo nevytvářejí hematopoetické kolonie. CFU-E tvoří erytroidní kolonie, tj. kolonie obsahující červené krvinky a jejich prekurzorové buňky.

Po třech dnech se spočítají hematopoetické kolonie, které se vytvořily. Přitom se porovnávají různé směsi. Všechny směsi nebyly vyšetřovány ve všech experimentech, směsi 1 až 3 jsou velmi podobné kontroly a každá z nich byla individuálně porovnána se směsí 4.

Směs 1: Buňky, které nebyly transfekovány retrovirem;

Směs 2: Buňky, které byly transfekovány prázdným vektorem pOS;

Směs 3: Buňky, které byly transfekovány genem GFP pro zelený fluoreskující protein ("green fluorescent protein"), tj. proteinem, který není hematopoeticky účinný,

Směs 4: Buňky, které byly transfekovány pOSPRV-1 (vektor + gen podle předkládaného vynálezu).

Tabulka 1: shrnuje výsledky získané ve třech experimentech, které byly provedeny, jak je výše popsáno. Čísla ukazují pro každý případ počet vytvořených kolonií.

	Směs 1	Směs 2	Směs 3	Směs 4
	Netransfekované	Prázdný vektor (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
Experiment 1	116	156	80	326
Experiment 2		271	273	410
Experiment 3	120		131	291

Tento experiment ukázal, že buňky CFU-E, které byly transfekovány PRV-1 vytvářejí mnohem více kolonií (až třikrát více) než různé kontrolní buňky. Výsledek ukazuje na to, že PRV-1 je růstový faktor pro CFU-E.

Příklad 3

Rozpustnost růstového faktoru PRV-1

Další experiment byl proveden proto, aby se zjistilo, zda je PRV-1 rozpustný růstový faktor nebo zda je nutný kontakt mezi buňkami (kontakt buňka-buňka). Ve sbalovací

buněčné linii 293-T není po transfekci vektory pOS a pKAT produkován jen retrovirus. Navíc buňky 293-T také syntetizují protein kódovaný genem klonovaným do pOS, tj. v daném případě genem PRV-1. Jestliže je genový produkt rozpustný protein, je secernován do média, ve kterém je sbalovací buněčná linie 293-T. Jestliže jsou buňky 293-T transfekovány jen vektorem pOS bez vektoru pKAT, nevytváří se žádný retrovirus. Buněčné kultivační médium pak obsahuje jen rozpustný protein produkováný buňkami. Médium pocházející z kultivace buněk transfekovaných pOS-PRV-1, neobsahující retrovirus, se smíchá s CFU-E a směs je vyseta methylcelulózové médium, pak se spočítají vzniklé kolonie. V tomto pokusu byly získány následující výsledky:

Tabulka 2: Rozpustnost PRV-1. Uváděná čísla představují počet kolonií.

	Směs 1	Směs 2	Směs 3	Směs 4
	Netransfekované	Prázdný vektor (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
Experiment 4		137	187	557

V tomto pokusu buňky CFU-E, které byly ošetřeny médiem obsahujícím PRV-1 vytvářely mnohem více hematopoetických kolonií než kontrolní buňky. Z tohoto výsledku lze usoudit, že PRV-1 je rozpustný růstový faktor.

Příklad 4

PRV-1 má také inhibiční, cytostatický účinek

Experiment byl proveden s buňkami periferní krve. Jelikož u zdravých jedinců malý počet prekurzorových buněk cirkuluje také v periferní krvi, je možné vykultivovat ve vhodném médiu (s methylcelulózou) hematopoetické kolonie z buněk periferní krve. Zdravým dárčům bylo odebráno 40 ml krve z periferní žíly (přičemž byl užit heparin nebo EDTA jako antikoagulační činidlo). Ke krvi bylo přidáno 15 ml Ficoll/Hypaque a tato směs byla centrifugována při 1600 ot./min (rpm) po 40 minut bez brždění. Výsledkem byl hustotní gradient, který frakcionoval krev na buněčné složky. Po centrifugaci se v mezifázi mezi sérem a Ficollem nacházejí buňky zvané mononukleární buňky, které zahrnují i kmenové buňky. Tato mezifáze byla odebrána a promyta v PBS (isotonický roztok soli). Tak byly získány purifikované mononukleární buňky, z nichž přibližně 0,1 % tvoří hematopoetické kmenové buňky.

Mononukleární buňky byly přeneseny do zvláště bohatého média (IMDM) obsahujícího přísadek 3 % FCS (fetálního telecího séra). Toto médium 3% FCS/IMDM pak bylo modifikováno, tj. bylo užito s přísadkem PRV-1 nebo bez.

Mononukleární buňky v IMDM byly přidány, v hustotě 7×10^5 buněk/ml, ke komerčně dostupnému médiu od firmy Stem Cells Technologies (Methocult), obsahujícímu IMDM a 30% FCS, 1% BSA (hovězí sérový albumin), merkaptoethanol, 2 mM L-glutamin, 3 IU EPO (erytropoetin)/ml a 1,0% methylcelulózu. Buňky v tomto médiu rostly 14 dní. Z několika kmenových buněk přítomných v této směsi se vyvinuly hematopoetické kolonie.

Obvykle se na každých 7×10^5 buněk vyvinulo 100 až 200 hematopoetických kolonií.

Byla zkonstruována také buněčná linie exprimující velmi vysoké množství PRV-1. PRV-1 produkovaný těmito buňkami byl změněn tak, že již neobsahoval lipidovou kotvu. Expresní produkt sestával z aminokyselin 1 až 401 ze sekvence id. č. 2, tedy aminokyseliny 402 až 437 chyběly. Takto změněný PRV-1 proto není, na rozdíl od PRV-1 divokého typu, inkorporován do buněčné membrány pomocí lipidové kotvy, ale je plně secernován z buňky. Stejně jako v příkladu 3 buněčná linie sestával z buněk 293, které neprodukují žádný retrovirus, ale exprimují protein (PRV-1).

Pro test na hematopoetické kolonie byly přeneseny mononukleární krevní buňky buďto do média IMDM, které bylo inkubováno 48 hodin s netransfekovanými buňkami (293), nebo do média, které bylo inkubováno 48 hodin s buňkami, které exprimovaly změněný PRV-1 (označeny „293-GPI-less-PRV-1“). Schopnost těchto buněk tvořit hematopoetické kolonie pak byla zkoumána. Počet kolonií erytroidních (červených) a myeloidních (bílých) krevních buněk byl stanoven po 14 dnech. Experiment byl opakován třikrát a byl také proveden v různé dny a s různými dárci krve. Opakování byla také vyhodnocena v rámci tohoto pokusu. Byly získány následující výsledky:

Experiment 1

supernatant	Dárce 1		Dárce 2	
	Červené kolonie	Bílé kolonie	Červené kolonie	Bílé kolonie
293	248/221	70/114	127/161	25/66
293-GPI-less-PRV-1	7/3	0/0	31/19	0/0

Experiment 2

supernatant	Dárce 1		Dárce 2	
	Červené kolonie	Bílé kolonie	Červené kolonie	Bílé kolonie
293	99/91	20/19	49/33	8/1
293-GPI-less-PRV-1	0/0	0/0	4/0	0/0

Experiment 3

supernatant	Dárce 1		Dárce 2	
	Červené kolonie	Bílé kolonie	Červené kolonie	Bílé kolonie
293	107/207	22/30	24/32	5/8
293-GPI-less-PRV-1	4/3	0/6	0/1	3/0

Z těchto dar lze uzavřít, že dávka PRV-1 vyšší, než která byla užita v příkladu 3, projevuje cytostatický účinek.

Příklad 5

Růstový faktor PRV-1 je N-glykosylován

Z pacientů trpících p. vera byly izolovány granulocyty, a z těchto buněk byly připraveny proteinové extrakty standardními postupy. Proteinové extrakty byly dále zpracovány podle protokolu pro soupravu "N-Glycosidase F Deglycosylation Kit" od firmy Boehringer Mannheim. To znamená, že "denaturační pufr" ze soupravy byl přidán k proteinovým extraktům a směsi pak byly zahřáty na 95 °C na 3 minuty, a pak bylo dále užito buďto "reakčního pufru" nebo "reakčního

pufu" s N-glykosidázou. Každá směs byla inkubována přes noc ve 37 °C a proteiny pak byly analyzovány PAGE gelové elektroforéze následované Western blotem. protein PRV-1 byl detekován pomocí protilátky namířené proti proteinu majícímu aminokyselinovou sekvenci id. č. 5. Výsledky ukázaly, že zatímco protein PRV-1 purifikovaný z granulocytů má velikost 60 až 65 kDa, po naštěpení N-glykosidázou má velikost jen 40 kDa. To jasně dokazuje, že PRV-1 je glykosylován na asparaginovém zbytku (asparagin = N).

SEZNAM SEKVENCÍ

<210> 1
 <211> 1600
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <223>

<400> 1

aaaagcagaa agagattacc agccacagac gggcatgag cgcggtatta ctgctggccc	60
tccctgggggtt catcctccca ctgccaggag tgcaggcgct gctctgccag tttgggacag	120
ttcagcatgt gtggaagggtg tccgacctgc cccggcaatg gacccctaag aacaccagct	180
gcgacagcgg cttgggggtgc caggacacgt tgatgctcat tgagagcgga cccaagtga	240
gcctgggtgct ctccaagggc tgcacggagg ccaaggacca ggagccccgc gtcactgagc	300
accggatggg ccccggcctc tccctgatct cctacacctt cgtgtgccgc caggaggact	360
tctgcaacaa cctcgttaac tccctccgc tttgggcccc acagccccca gcagaccag	420
gaccccttgag gtgcccagtc tgcttgtcta tggaaggctg tctggagggg acaacagaag	480
agatctgccc caaggggacc acacactgtt atgatggcct cctcaggctc aggggaggag	540
gcatcttctc caatctgaga gtccagggat gcatgccccca gccagggtgc aacctgctca	600
atgggacaca ggaaattggg cccgtgggta tgactgagaa ctgcaatagg aaagattttc	660
tgacctgtca tcgggggacc accattatga cacacggaaa cttgggtcaa gaaccactg	720
attggaccac atcgaatacc gagatgtgcg aggtggggca ggtgtgtcag gagacgctgc	780
tgctcataga tgtaggactc acatcaacct tgggtggggac aaaaggctgc agcactgttg	840

27.03.00

```

gggctcaaaa ttcccagaag accaccatcc actcagcccc tccctgggggtg cttgtggcct      900
cctataccca cttctgctcc tcggacctgt gcaatagtgc cagcagcagc agcggttctgc      960
tgaactccct cctcctcaa gctgcccctg tcccaggaga ccggcagtgt cctacctgtg      1020
tgcagcccct tggaacctgt tcaagtggct cccccgaat gacctgcccc agggggcgcca      1080
ctcattgtta tgatgggtac attcatctct caggagggtgg gctgtccacc aaaatgagca      1140
ttcagggtcg cgtggcccaa ccttcagct tcttggtgaa ccacaccaga caaatcgga      1200
tcttctctgc gcgtgagaag cgtgatgtgc agcctcctgc ctctcagcat gagggagggtg      1260
gggctgaggg cctggagtct ctcaactggg ggggtggggct ggcactggcc ccagecgtgt      1320
gggtggggagt ggtttgcct tccgtctaac tctattaccc ccacgattct tcaccgtgc      1380
tgaccacca cactcaacct cctctgacc tcataaccta atggccttgg acaccagatt      1440
ctttccatt ctgtccatga atcatcttcc ccacacacaa tcattcatat ctactcacct      1500
aacagcaaca ctggggagag cctggagcat ccggacttgc cctatgggag aggggacgct      1560
ggaggagtgg ctgcatgtat ctgataatac agaccctgtc      1600

```

<210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Ala Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Phe Ile Leu Pro Leu
  1           5           10           15
Pro Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Gln Phe Gly Thr Val Gln His Val
          20           25           30
Trp Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn Thr Ser
          35           40           45
Cys Asp Ser Gly Leu Gly Cys Gln Asp Thr Leu Met Leu Ile Glu Ser
          50           55           60
Gly Pro Gln Val Ser Leu Val Leu Ser Lys Gly Cys Thr Glu Ala Lys
          65           70           75           80
Asp Gln Glu Pro Arg Val Thr Glu His Arg Met Gly Pro Gly Leu Ser
          85           90           95
Leu Ile Ser Tyr Thr Phe Val Cys Arg Gln Glu Asp Phe Cys Asn Asn
          100          105          110
Leu Val Asn Ser Leu Pro Leu Trp Ala Pro Gln Pro Pro Ala Asp Pro
          115          120          125
Gly Ser Leu Arg Cys Pro Val Cys Leu Ser Met Glu Gly Cys Leu Glu
          130          135          140
Gly Thr Thr Glu Glu Ile Cys Pro Lys Gly Thr Thr His Cys Tyr Asp
          145          150          155          160
Gly Leu Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Phe Ser Asn Leu Arg Val
          165          170          175

```

Gln Gly Cys Met Pro Gln Pro Gly Cys Asn Leu Leu Asn Gly Thr Gln
 180 185 190
 Glu Ile Gly Pro Val Gly Met Thr Glu Asn Cys Asn Arg Lys Asp Phe
 195 200 205
 Leu Thr Cys His Arg Gly Thr Thr Ile Met Thr His Gly Asn Leu Ala
 210 215 220
 Gln Glu Pro Thr Asp Trp Thr Thr Ser Asn Thr Glu Met Cys Glu Val
 225 230 235 240
 Gly Gln Val Cys Gln Glu Thr Leu Leu Leu Ile Asp Val Gly Leu Thr
 245 250 255
 Ser Thr Leu Val Gly Thr Lys Gly Cys Ser Thr Val Gly Ala Gln Asn
 260 265 270
 Ser Gln Lys Thr Thr Ile His Ser Ala Pro Pro Gly Val Leu Val Ala
 275 280 285
 Ser Tyr Thr His Phe Cys Ser Ser Asp Leu Cys Asn Ser Ala Ser Ser
 290 295 300
 Ser Ser Val Leu Leu Asn Ser Leu Pro Pro Gln Ala Ala Pro Val Pro
 305 310 315 320
 Gly Asp Arg Gln Cys Pro Thr Cys Val Gln Pro Leu Gly Thr Cys Ser
 325 330 335
 Ser Gly Ser Pro Arg Met Thr Cys Pro Arg Gly Ala Thr His Cys Tyr
 340 345 350
 Asp Gly Tyr Ile His Leu Ser Gly Gly Gly Leu Ser Thr Lys Met Ser
 355 360 365
 Ile Gln Gly Cys Val Ala Gln Pro Ser Ser Phe Leu Leu Asn His Thr
 370 375 380
 Arg Gln Ile Gly Ile Phe Ser Ala Arg Glu Lys Arg Asp Val Gln Pro
 385 390 395 400
 Pro Ala Ser Gln His Glu Gly Gly Gly Ala Glu Gly Leu Glu Ser Leu
 405 410 415
 Thr Trp Gly Val Gly Leu Ala Leu Ala Pro Ala Leu Trp Trp Gly Val
 420 425 430
 Val Cys Pro Ser Cys
 435

<210> 3
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> 5'-konec sekvence PRV-1
 <400> 3

aaaagcagaa agagattacc agcc

24

<210> 4
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> antisense molekula

<400> 4

ggctggtaat ctctttctgc tttt

24

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> aminokyseliny 34 až 46 z PRV-1

<400> 5

Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Pro	Arg	Gln	Trp	Thr	Pro	Lys	Asn
1				5					10			

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> aminokyseliny 391 až 405 z PRV-1

<400> 6

Ser	Ala	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Val	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gln	His
1				5					10				15	

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> RT-primer

<400> 7

attaggttat gaggtcagag ggaggtt

27

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> sense primer

<400> 8

gcagaaagag attaccagcc acagacgg

28

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> antisense primer

<400> 9

gaatcgtggg ggtaatagag ttagcagg

28

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> sonda

<400> 10

ttcttggtga accacaccag acaaatcgg

29

27.03.02

JV2002-1094

~~23805~~

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití N-glykosylovaného polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho fragmentu s nejméně 50 aminokyselinami,

nebo polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky aktivní varianty,

pro výrobu léku působícího jako růstový faktor.

2. Použití N-glykosylovaného polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;
nebo jeho fragmentu s nejméně 50 aminokyselinami,
nebo polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících
aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky
aktivní varianty,
pro výrobu léku k léčení pancytopenií a pancytopatií v kostní
dřeni a v krevním oběhu.

3. Použití polynukleotidu obsahujícího v podstatě jednu
z následujících nukleotidových sekvencí:

nukleotidy 1 až 1600 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1238 ze sekvence id. č. 1;

nebo jeho fragmentu nebo jeho varianty
pro výrobu léku k léčení pancytopenií a pancytopatií v kostní
dřeni a v krevním oběhu.

4. Použití N-glykosylovaného polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho fragmentu s nejméně 50 aminokyselinami,

nebo polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky aktivní varianty,

pro výrobu léku k léčení a/nebo zmnožení buněk, které jsou tělu vlastní a/nebo buněk zavedených buněčných linií *ex vivo* nebo *in vitro*.

5. Použití N-glykosylovaného polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho fragmentu s nejméně 50 aminokyselinami,
nebo polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících
aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky
aktivní varianty,
pro výrobu léku k inhibici růstu buněk.

6. Použití podle nároku 5, kdy se polypeptid užije jako
cytostatikum.

7. Použití N-glykosylovaného polypeptidu obsahujícího
v podstatě jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;

nebo jeho fragmentu s nejméně 50 aminokyselinami,
nebo polypeptidu obsahujícího v podstatě jednu z následujících
aminokyselinových sekvencí:

aminokyseliny 1 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 1 až 401 ze sekvence id. č. 2;

aminokyseliny 22 až 437 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 409 ze sekvence id. č. 2;
aminokyseliny 22 až 401 ze sekvence id. č. 2;
nebo jeho biologicky aktivního fragmentu nebo jeho biologicky
aktivní varianty,
pro výrobu léku k léčení proliferativních onemocnění.

8. Použití podle nároku 7, kde proliferativních onemocnění je
vybráno ze skupiny obsahující myeloproliferativní nemoci,
p. vera, esenciální trombocytémii, myelofibrózu, CML, všechny
leukémie, lymfomy a solidní nádory.

9. Použití polynukleotidu obsahujícího v podstatě jednu
z následujících nukleotidových sekvencí:

nukleotidy 1 až 1600 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1238 ze sekvence id. č. 1;

nebo jeho fragmentu nebo jeho varianty
pro výrobu léku k potlačení růstu buněk.

10. Použití polynukleotidu obsahujícího v podstatě jednu
z následujících nukleotidových sekvencí:

nukleotidy 1 až 1600 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 36 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 39 až 1238 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1346 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1262 ze sekvence id. č. 1;
nukleotidy 99 až 1238 ze sekvence id. č. 1;

nebo jeho fragmentu nebo jeho varianty
pro výrobu léku k léčení proliferativních onemocnění.

11. Použití podle nároku 10, kde proliferativních onemocnění je vybráno ze skupiny obsahující myeloproliferativní nemoci, *p. vera*, esenciální trombocytémií, myelofibrózu, CML, všechny leukémie, lymfomy a solidní nádory.

27.03.02

PV 2002-1094

23905-

1/2

Obr. 1

AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCAATGAGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCC
TGGGGTTTCATCCTCCCCTGCCCAGGAGTGCAGGCGCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTTCAGC
ATGTGTGGAAGGTGTCCGACCTGCCCCGGCAATGGACCCCTAAGAACACCAGCTGCGACAGCG
GCTTGGGGTGCCAGGACACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCT
CCAAGGGCTGCACGGAGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCCGATGGGCCCCG
GCCTCTCCCTGATCTCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTA
ACTCCCTCCCGCTTTGGGCCCCACAGCCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCAGTCT
GCTTGCTCTATGGAAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCAAGGGGACCACAC
ACTGTTATGATGGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGG
GATGCATGCCCCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCGTGGGTA
TGACTGAGAACTGCAATAGGAAAGATTTTCTGACCTGTCATCGGGGGACCACCATTATGACAC
ACGGAAACTTGGCTCAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGG
GGCAGGTGTGTCAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCCTGGTGGGA
CAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCCCTC
CTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCA
GCAGCAGCGTTCTGCTGAACTCCCTCCCTCCTCAAGCTGCCCCCTGTCCCAGGAGACCGGCACT
GTCCTACCTGTGTGCAGCCCCCTTGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCGAATGACCTGCCCA
GGGGCGCCACTCATTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAA
TGAGCATTCAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTGAACCACACCAGACAAATCG
GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCTCTCAGCATGAGGGAGGTG
GGGCTGAGGGCCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTGGT
GGGGAGTGGTTTGGCCCTTCTGCTAACTCTATTACCCCCACGATTCTTCACCGCTGCTGACCA
CCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTCATAACCTAATGGCCTTGGACACCAGATTCTTTCCCAT
TCTGTCCATGAATCATCTTCCCCACACACAATCATTCATATCTACTCACCTAACAGCAACACT
GGGGAGAGCCTGGAGCATCCGGAATTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTGGCTGCA
TGTATCTGATAATACAGACCCTGTC

27.03.02

2/2

Obr. 2

MSAVLLLALLGFILPLPGVQA---LLCQFGTVQHVWKVSDLPRQWTPKNTSCD
SGLGCQDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISY
TFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEI
CPKGTTHCYDGLLRRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMT
ENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSNTEMCEVGQVCQETLLL
IDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLN
SASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATH
CYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQP
PASQHEGGGAEGLES LTWGVGLALAPALWGVVCPSC