

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1997 - 488

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12

C 12 N 1/21

C 12 P 21/02

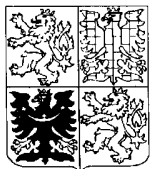
C 07 K 14/535

A 61 K 38/00

A 61 P 7/00

/(C 12 N 5/10, C 12 P 21/08, C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.10.1990**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.10.1989 11.06.1990**
24.08.1990 01.10.1990

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1989/422383 1990/537198**
1990/573616 1990/589701

(33) Země priority: **US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(71) Přihlašovatel:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US;

(72) Původce:

Zsebo Krisztina M., Thousand Oaks, CA, US;

Suggs Sideny Vaughn, Newbury Park, CA, US;

Bosselmann Robert A., Thousand Oaks, CA, US;

Martin Francis Hall, Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Čištěný a izolovaný polypeptid, jeho použití,
DNA sekvence pro jeho expresi a
farmaceutická kompozice**

(57) Anotace:

Čištěný a izolovaný polypeptid mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence uvedené na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hematopoetickou biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk. Použití tohoto polypeptidu pro výrobu léčiva pro hematopoetickou terapii savce. Farmaceutická kompozice obsahující účinné množství tohoto polypeptidu a farmaceuticky přijatelné ředidlo, přísadu nebo nosič. DNA sekvence pro použití při expresi tohoto polypeptidu v prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňce.

28838

01-329-97-Če

Čištěný a izolovaný polypeptid, jeho použití, DNA sekvence pro jeho expresi a farmaceutická kompozice

Oblast techniky

Vynález se týká čištěného a izolovaného polypeptidu vykazujícího hematopoietickou biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk, jeho použití pro výrobu léčiv, DNA sekvence pro jeho expresi a farmaceutické kompozice na bázi tohoto peptidu.

Dosavadní stav techniky

Lidský krev-vytvářející (hemopoetický) systém je složen z variant bílých krvinek (zahrnujících neurofily, makrofágy, basofily, mast buňky, eosinofily, T a B buňky), červených krvinek (erytrocytů) a buněk, vytvářejících sraženinu (megakaryocyty, destičky).

Předpokládá se, že malé množství jistých hemopoetických růstových faktorů odpovídá za diferenciaci malého množství "kmenových buněk" ("stem cells") v různých progenitorech krevních buněk pro ohromnou proliferaci těchto buněk a nevratnou diferenciaci zralých buněk z těchto linií. Za normálních podmínek funguje hemopoetický regenerační systém dobře. Jakmile je stresován chemoterapií, radiací nebo přirozeným myeloplastickým porušením, vyskytne se u pacienta určité období, během něhož jsou pacienti postiženi vážnou leukopenií, anemií nebo trombocytopenií. Vývoj a užití

1302

ato 0
hemopoetických faktorů urychluje regeneraci kostní dřeně během této nebezpečné fáze.

V jistých virově indukovaných poruchách jako je syndrom získané imundeficience (AIDS), mohou být krevní elementy jako jsou T-buňky, specificky zničeny. Zvýšení produkce T-buněk může být v takových případech terapeutické.

Protože hemopoetické růstové faktory jsou přítomné v extrémně malých množstvích, je jejich detekce a identifikace prováděna řadou zkoušek, které dosud jediné činí rozdíl mezi různými faktory, na bázi stimulačních účinků na kultivované buňky při umělých podmínkách.

Aplikace rekombinantních genetických technik byla vyjasněna pochopením biologických aktivit jednotlivých růstových faktorů. Například aminokyselinová a DNA sekvence pro lidský erythropoetin (EPO), který stimuluje produkci erytrocytů, byla získána (viz Lin, US patent 4703008, který je zde uveden jako odkaz). Rekombinantní metody byly také aplikovány pro izolaci cDNA pro stimulační faktor lidských granulocytových buněk, G-CSF (viz Souza, US patent č. 4810643, uvedený zde jako odkaz) a stimulující faktor lidských granulocytových makrofágových buněk (GM-CSF) (Lee a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 82 4360-4364/1985), Wong a spol., Science, 228, 810-814 (1985), myši G- a GM-CSF (Yokota a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. (USA), 81, 1070 (1984), Fung a spol., Nature, 30, 233 (1984), Cough a spol., Nature, 309, 763 (1984)) a lidské makrofágové kolonie stimulující faktor (CSF-1) (Kawasaki a spol., Science, 230, 291 (1985)).

"High Proliferative Potential Colony Forming Cell"

(HPP-CFC) zkouškový systém testuje činnost faktorů v ranných hemopoetických progenitorech (Zont., J.Expr.Med. 159, 679-690 (1984)). V literatuře existuje množství zpráv o faktorech, které jsou aktivní v HPP-CFC zkoušce. Zdroj těchto faktorů jsou uvedeny v tabulce 1. Nejlépe charakterizované faktory jsou uvedeny dále.

Aktivita v upraveném mediu lidské sleziny byla pojmenována synergický faktor (SF). Několik lidských tkání a lidských a myších buněčných linií produkuje SF označený SF-1, který je synergický s CSF-1, ke stimulaci ranné HPP-CSF. SF-1 byl zjištěn v upraveném mediu buněk lidské sleziny, lidské placenty, 5637 buněk (buňky karcinomu měchýře). aEMT-6 buněk (linie buněk karcinomu prsní žlázy myši). Totožnost SF-1 je právě určována. Počáteční výsledky ukazovaly aktivitu SF-1 z buněčné linie 5637 převyšující aktivitu interleukinu (Zsebo a spol., Blood, 71, 962-968 (1988)). Další výsledky ukázaly, že kombinace interleukin-1 (IL-1) plus CSF-1 může stimulovat stejnou tvorbu kolonií, jako je možno získat s CSF-1 plus částečně čištěnými přípravky z 5637 upraveného media (McNiece, Blood, 73, 919 (1989)).

Synergický faktor přítomný v extraktu z dělohy březí myši je CSF-1. WEHI-3 buňky (buněčná linie buněk myši myelonomocytové leukemie) produkují synergický faktor, který se zdá být totožný s IL-3. Jak CSF-1 tak IL-3 stimulují ^{atp}hemopoetické progenitory, které jsou zralejší než cílený SF-1.

Bylo prokázáno, že jiná třída synergických faktorů je přítomna v mediu z buněk TC-1 (buňky odvozené ze stromatu kostní dřeně). Tato uněčná linie produkuje faktor, který stimuluje ranné myeloidní a lymfoidní buněčné typy. Byl

pojmenován jako hemolymfopoetický růstový faktor 1 (HLCF-1). Má zjevnou molekulovou hmotnost 120000 (McNiece a spol., Exp.Hematol., 16, 383 (1988)).

Ze známých interleukinů a CSF, byly IL-1, IL-3 a CSF-1 identifikovány jako aktivní ve zkoušce HPP-CPC. Další zdroje synergické aktivity uvedené v tabulce 1 nebyly strukturně identifikovány. Vztaženo na polypeptidovou sekvenci a profil biologické aktivity, týká se předložený vynález molekul, které se liší od IL-1, IL-3, hemopoetic-1 a SF-1.

Tabulka 1

Přípravky, obsahující faktory aktivní v HPP-CFC zkoušce

Zdroj ¹	odkaz
CM lidské sleziny	(Kriegler, Blood, 60, 503 (1982))
CM myší sleziny	(Bradley, Exp.Hematol.Today Baum.ed., 285(1980))
CM krysí sleziny	(Bradley, supra, (1980))
CM myších plic	(Bradley, supra, (1980))
CM lidské placenty	(Kriegler, supra (1982))
pregnantní myší děloha	(Bradley, supra, (1980))
GTC-C CM	(Bradley, supra, (1980))
RH3 CM	(Bradley, supra, (1980))
PHA PBL	(Bradley, supra, (1980))
WEHI-3B CM	(McNiece, Cell Ciol.Int.Rep., 6, 243 (1982))
EMT-6 CM	(McNiece, Exp.Hematol., 15, 854(1987))
CM L-buněk	Kriegler, Exp.Hematol., 12, 844(1984))
5637 CM	(Stanley, Cell, 45, 667 (1986))
TC-1 CM	(Song, Blood, 66, 273 (1985))

¹CM = upravená media

Při parenterálním podání jsou proteiny často a rychle odstraněny z oběhu a mohou zde tak vyvolat relativně krátkou farmakologickou aktivitu. Mohou tedy být potřebné časté injekce relativně velkých dávek bioaktivních proteinů k udržení terapeutické působnosti. Proteiny modifikované kovalentním spojením s polymery rozpustnými ve vodě, jako je polyethylenglykol, kopolymery polyethylenglykolu a polypropylenglykolu, karboxymethylceluloza, dextran, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon nebo polprolin jsou známy tím, že vykazují podstatně delší poločas v krvi po intravenózní injekci, než odpovídající nemodifikované proteiny (Abuchowski a spol., v: "Enzymes as Drugs", Holcenberg a spol., vyd. Wiley-Interscience, New York, NY, 367-383 (1981), Newmark a spol., J.Appl.Biolchem.4:185-189 (1982) a Katre a spol., Proc Natl.Acad.Sci. USA 84, 1487-1491 (1987)). Takové modifikace mohou také zvyšovat rozpustnost proteinu ve vodných roztocích, eliminovat agregaci, zvýšit fyzikální a chemickou stabilitu proteinu a značně snížit imunogenicitu a antigenicitu proteinu. Výsledkem je, že požadované biologické aktivity in vivo je možno dosáhnout podáním takového aduktu polymer-protein s menší frakvencí nebo v menších dávkách než v případě nemodifikovaného proteinu.

Připojení polyethylenglykolu (PEG) k proteinu je zvláště výhodné, protože PEG má velmi nízkou toxicitu pro savce (Carpenter a spol., Toxicol.Appl.Pharmacol., 18, 35-40 (1971)). Například PEG adukt adenosin deaminázy byl ve Spojených státech schválen pro použití u lidí při léčbě těžkých kombinovaných syndromů imunodeficiency. Druhou výhodou spojenou s konjugací s PEG je účinná redukce imunogenicity a antigenicity heterologních proteinů. Například PEG adukt lidského proteinu může být užitečný pro léčbu chorob v jiných

savčích druzích bez rizika vyvolání těžké imunologické odpovědi.

Polymery jako je PEG mohou být vhodně navázány na jeden nebo více reaktivních aminokyselinových zbytků v proteinu jako je alfa-aminoskupina aminokonce aminokyseliny, epsilon-aminoskupiny vedlejšího řetězce lysinu, sulfhydrylové skupiny vedlejšího řetězce cysteinu, karboxylové skupiny aspartylového a glutamylového vedlejšího řetězce, alfa-karboxylová skupina karboxyl-koncové aminokyseliny, tyrosinové vedlejší řetězce nebo k aktivovaným derivátům glykosylových řetězců, připojeným k určitým asparaginovým, serinovým nebo threoninovým zbytkům.

Bylo popsáno množství aktivovaných forem PEG vhodných pro přímou reakci s proteiny. Vhodné PEG reaktanty pro reakci s proteinovými aminoskupinami zahrnují aktivní estery karboxylové kyseliny nebo karbonátové deriváty, výhodně ty, ve kterých odštěpitelné skupiny jsou N-hydroxysukcimimid, p-nitrofenol, imidazol nebo 1-hydroxy-2-nitrobenzen-4-sulfonát. PEG deriváty, obsahující maleimido nebo halogenacetylové skupiny jsou vhodnými reaktanty pro modifikaci proteinů prostých sulfhydrylových skupin. Podobně PEG reaktant, obsahující aminové, hydrazinové nebo hydrazidové skupiny, jsou vhodné pro reakci s aldehydy generovanými jodistanovou oxidací karbohydrátových skupin v proteinech.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí faktoru, který způsobuje růst ranných hemopoetických progenitorových buněk.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je čištěný a izolovaný polypeptid mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence uvedené na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hematopo~~etickou~~ biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk.

Předmětem vynálezu jsou dále výhodná provedení čištěného a izolovaného polypeptidu podle výše uvedeného základního provedení, která zahrnují:

a) polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci; a

b) polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny, zahrnující následující sekvence vzhledem k aminokyselinové sekvenci na obr. 14C: 1-248, 1-193 a 1-162, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci.

Předmětem vynálezu je dále také DNA sekvence pro použití při expresi polypeptidových produktů popsanych výše v prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňce, kde uvedená DNA sekvence je vybrána z:

(a) DNA sekvencí uvedených na obr. 14C nebo jejich komplementárních řetězců,

(b) DNA sekvencí, které^u za stringentních podmínek hybridizují k DNA sekvencím definovaným pod (a) nebo jejich fragmentů a

(c) DNA sekvencí, které nebýt degenerace genetického kódu by hybridizovaly k DNA sekvencím definovaným v (a) a (b), přičemž tyto sekvence kódují polypeptid, mající stejnou aminokyselinovou sekvenci.

Předmětem vynálezu jsou dále výhodná provedení DNA sekvence podle výše uvedeného základního provedení, která zahrnují:

a) DNA sekvenci zahrnující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v ne-savčích buňkách;

b) DNA sekvenci obsahující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v E.coli buňkách;

c) DNA sekvenci obsahující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v kvasinkových buňkách;

d) DNA sekvenci podle základního provedení nebo podle provedení uvedených v odstavcích a) až b), která kóduje expresi methionylového zbytku na N-terminální poloze maturované verze uvedeného polypeptidu;

e) DNA sekvenci podle základního provedení nebo podle provedení uvedených v odstavcích a) až d), kovalentně spojenou s detegovatelným značením; a

f) DNA sekvenci podle odstavce e), kde značení je radioaktivní značení.

Předmětem vynálezu je dále také farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje účinné množství kteréhokoliv z výše popsanych polypeptidů podle vynálezu a farmaceuticky přijatelné ředidlo, přísadu nebo nosič.

Předmětem vynálezu je dále také použití kteréhokoliv z výše popsaných polypeptidů podle vynálezu pro výrobu léčiva pro hematopoietickou terapii savce.

Zejména se může jednat o léčivo pro

a) léčbu leukopenie, léčbu trombocytopenie, léčbu anemie, zvýšení příjmu transplantátu kostní dřeně, zvýšení obnovy kostní dřeně při léčbě ozařováním, chemicky nebo chemoterapeuticky indukované aplasii kostní dřeně nebo myelosupresi a pro zvyšování citlivosti buněk k chemoterapii;

b) pro zvýšení počtu buněk schopných transplantace po aspiraci kostní dřeně nebo periferní krevní leukoferesi;

c) pro léčení AIDS, myelofibrosis, myelosklerosis, osteoporosis, metastatického karcinomu, akutní leukemie, mnohotného myelomu, Hodgkinovy choroby lymfomu, Gaucherovy choroby, Niemann-Pickovy choroby, Letterer-Siwovy choroby, odolné erythroblastické anemie, Di Guglielmova syndromu, kongestivní splenomegalie, Kala azar, sarkoidosis, primární splenické pancytopenie, miliární tuberkulózy, rozseté plísňové choroby, prudké septikémie, malárie, deficiencie vitamínu B₁₂, deficiencie kyseliny folové a pyridoxinové deficiencie u savců;

d) pro léčení poškození nervů, infertility nebo intestinálního poškození u savce; a

e) pro léčení hypopigmentační poruchy.

Předmětem vynálezu je i takové použití, kde vyráběné léčivo dále obsahuje alespoň jeden další hematopoietický faktor vybraný z

a) EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 a IGF-1;

b) IL-8, IL-9 a IL-10; a

c) IL-11 a LIF.

Výše uvedené sekvence DNA mohou být zavedeny do vhodných vektorů, těmito vektory mohou být transformovány nebo transfekovány vhodné hostitelské buňky, kterých pak lze použít k produkci peptidů podle vynálezu.

Faktor kmenových buněk (SCF) se může získávat z materiálu, který jej obsahuje za použití technik ionexové chromatografie nebo/a separace kapalinovou chromatografií s reversní fází.

Prodloužení poločasu in vivo a zvýšené účinnosti u savců se může dosáhnout převedením peptidů podle vynálezu na konjugáty, v nichž je SCF kovalentně konjugovaný s polymerem, který je rozpustný ve vodě jako je polyethylenglykol nebo kopolymery polyethylenglykolu a polypropylenglykolu, přičemž uvedený polymer je nesubstituovaný nebo je na jednom konci substituován alkylovou skupinou. Příprava takového aduktu zahrnuje reakci SCF s polymerem rozpustným ve vodě, majícím alespoň jednu koncovou reaktivní skupinu a čištění výsledného aduktu za vzniku produktu s rozšířeným ohěhovým poločasem a zvýšenou biologickou účinností.

Popis obrázků na připojených výkresech:

Obr. 1 představuje aniontovýměnný chromatogram z čištění savčího SCF.

Obr. 2 představuje chromatogram z gelové filtrace z čištění savčího SCF.

Obr. 3 představuje chromatogram na aglutininu z pšeničných klíčků-agaroze z čištění savčího SCF.

Obr. 4 představuje kationtovýměnný chromatogram z čištění savčího SCF.

Obr. 5 představuje C₄ chromatogram z čištění savčího SCF.

Obr. 6 představuje elektroforézu na dodecylsulfát sodný (SDS)-polyakrylamidovém gelu (PAGE) (SDS-PAGE) frakcí z C₄ kolony z obr. 5.

Obr. 7 představuje analytický C₄ chromatogram savčího SCF.

Obr. 8 představuje SDS-PAGE C₄ kolonových frakcí z obr. 7.

Obr. 9 představuje SDS-PAGE čištěného savčího SCF a deglykosylovaného savčího SCF.

Obr. 10 představuje analytický chromatogram čištěného savčího SCF.

Obr. 11 představuje aminokyselinovou sekvenci savčího SCF odvozenou ze sekvenování proteinu.

Obr. 12 představuje

- A. oligonukleotidy kryší SCF cDNA
- B. oligonukleotidy lidské SCF DNA
- C. univerzální oligonukleotidy.

Obr. 13 představuje

- A. schema polymerasové řetězové reakce (PCR) amplifikací kryší SCF cDNA
- B. schema PCR amplifikace lidské SCF cDNA.

Obr. 14 představuje

- A. sekvenční strategii pro kryší genomovou DNA
- B. sekvenci nukleokyselin kryší genomové DNA
- C. sekvenci nukleokyselin kryší SCF cDNA a aminokyselinovou sekvenci kryšího SCF proteinu.

Obr. 15 představuje

- A. strategii sekvenování lidské genomové DNA
- B. sekvenci nukleové kyseliny lidské genomové DNA
- C. kompozit sekvence nukleové kyseliny lidské SCF cDNA a aminokyselinové sekvence SCF proteinu.

Obr. 16 představuje seřazené aminokyselinové sekvence lidského, opičího, psího, myšího a krysího SCF proteinu.

Obr. 17 představuje strukturu vektoru V19.8 SCF savčích buněk.

Obr. 18 představuje strukturu expresního vektoru pDSVE.1 savčích CHO buněk.

Obr. 19 představuje strukturu E.coli expresního vektoru pCFM156.

Obr. 20 představuje

- A. radioimunostudii savčího SCF
- B. SDS-PAGE imunitně vysráženého savčího SCF.

Obr. 21 představuje Western analýzy rekombinantního lidského SCF.

Obr. 22 představuje Western analýzy rekombinantního krysího SCF.

Obr. 23 představuje sloupcový diagram účinku COS-1 buňkami produkováného rekombinantního krysího SCF na transplantaci kostní dřeně.

Obr. 24 představuje účinek rekombinantního krysího SCF na

léčení makrocytické anemie myši Steel.

Obr. 25 představuje periferní bílé krvinky (WBC) u myši Steel ošetřených rekombinantním krysím SCF.

Obr. 26 představuje počet destiček u myši Steel ošetřených rekombinantním krysím SCF.

Obr. 27 představuje rozdíl v počtu WBC u Steel myši ošetřených rekombinantním SCF¹⁻¹⁶⁴PEG25.

Obr. 28 představuje lymfocytové subsety Steel myši ošetřených rekombinantním krysím SCF¹⁻¹⁶⁴PEG25.

Obr. 29 představuje účinek rekombinantní lidské sekvence SCF při ošetření normálních primátů se zvýšeným počtem periferních WBC.

Obr. 30 představuje účinek rekombinantní lidské sekvence SCF při ošetření normálních primátů na zvýšení počtu hematokritů a destiček.

Obr. 31 představuje fotografie

A. kolonií lidské kostní dřen stimulované rekombinantním lidským SCF¹⁻¹⁶²

B. Wright-Giemsa vybarvených buněk z kolonií na obr. 31

Obr. 32 představuje SDS-PAGE frakcí z chromatogramu na sloupci S-Sepharosy uvedeného na obr. 33

A. s redukčním činidlem

B. bez redukčního činidla.

Obr. 33 je chromatogram rekombinantního lidského SCF odvozeného z E.coli na S-Sepharosové koloně.

Obr. 34 představuje SDS-PAGE frakcí C₄ kolony z chromatogramu uvedeného na obr. 35

A. s redukčním činidlem

B. bez redukčního činidla.

Obr. 35 je chromatogram rekombinantního lidského SCF odvozeného z E.coli na C₄ koloně.

Obr. 36 představuje chromatogram na koloně Q-Sepharosy z CHO odvozeného rekombinantního krysího SCF.

Obr. 37 představuje chromatogram C₄ kolony rekombinantního krysího SCF odvozeného od CHO.

Obr. 38 představuje SDS-PAGE frakcí C₄ kolony z chromatogramu uvedeného na obr. 37.

Obr. 39 představuje SDS-PAGE čištěného z CHO odvozeného rekombinantního krysího SCF před a po deglykosylací.

Obr. 40 představuje

A. gelovou filtrační chromatografií reakční směsi rekombinantního krysího pegylovaného SCF¹⁻¹⁶⁴

B. gelovou filtrační chromatografií rekombinantního krysího SCF¹⁻¹⁶⁴, nemodifikovaného.

Obr. 41 představuje radioaktivně značený SCF vázaný k čerstvým leukemickým blastům.

Obr. 42 představuje sekvenci lidské SCF cDNA získanou z HT1080 fibrosarkomové buněčné linie.

Obr. 43 představuje autoradiograf z COS-7 buněk exprimujících lidský SCF¹⁻²⁴⁸ a CHO buněk, exprimujících lidský SCF¹⁻¹⁶⁴.

Obr. 44 představuje cDNA sekvenci lidského SCF získaného z linie 5637 buněk karcinomu měchýře.

Obr. 45 představuje zvýšené přežití ozářených myší po ošetření SCF.

Obr. 46 představuje zvýšení přežití ozářených myší po transplantaci kostní dřeně s 5 % stehenní kosti a ošetření SCF.

Obr. 47 představuje zvýšení přežití ozářených myší po transplantaci kostní dřeně 0,1 a 20 % stehenní kosti a ošetření SCF.

Množství aspektů a výhod předloženého vynálezu bude zřejmé odborníkům z následujícího podrobného popisu, který slouží k ilustraci praktického provedení vynálezu v jeho zvláště výhodných provedeních.

Podrobný popis vynálezu

V souladu s předloženým vynálezem je poskytnut nový čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 14.

V souladu s předloženým vynálezem je poskytnut nový

čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 14B.

Dále je poskytnut čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci 1 až 176 jak je uvedena na obr. 14B popřípadě s dalším methioninovým zbytkem na N-konci.

V souladu s předloženým vynálezem je poskytnut nový čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 14C.

Dále je poskytnut čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci 1-248, 1-193 a 1-162 jak je uvedena na obr. 14C.

Výraz "faktor kmenový buněk" nebo "SCF" jak je zde použit, se vztahuje na přirozeně se vyskytující SCF (tj. přirozený lidský SCF) jakož i na přirozeně se nevyskytující (tj. odlišné od přirozeně se vyskytujících) polypeptidy, mající aminokyselinové sekvence a glykosylaci dostatečně shodnou s těmito vlastnostmi přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk tak, aby poskytla schopnost hematopoetické biologické aktivity přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk. Faktor kmenových buněk má schopnost stimulovat růst ranných hematopoetických progenitorů, které jsou schopné zrání na erytrocyty, megakaryocyty, granulocyty, lymfocyty a makrofágy. Léčba savců pomocí SCF přinesla výsledky v absolutním zvýšení počtu hematopoetických buněk jak myeloidní tak lymfoidní linie. Jednou z hlavních charakteristik kmenových buněk je jejich schopnost diferencovat mezi myeloidními a lymfoidními buňkami

(Weissman, Science, 241, 58-62 (1988)). Léčba Steel myši (příklad 8B) rekombinantním krysím SCF přinesla zvýšení počtu granulocytů, monocytů, erythrocytů, lymfocytů a krevních destiček. Léčba normálních primátů rekombinantním lidským SCF přinesla zvýšení počtu myeloidních a lymfoidních buněk (příklad 8C).

Embryonální exprese SCF probíhá v buňkách migračním způsobem a v mateřských místech melanoblastů, zárodečných buněk, hematopoetických buněk, mozku a hřbetní míchy.

Ranné hematopoetické progenitorové buňky byly namnoženy v kostní dřeni savců, kteří byli léčeni 5-fluoruracilem (5-FU). Chemoterapeutické léčivo 5-FU selektivně vyčerpává pozdní hematopoetické progenitory. SCF je aktivní v kostní dřeni na místech 5-FU.

Biologická aktivita a model táňové distribuce SCF ukazuje jeho centrální úlohu v embryogenesi a hematopoeze, jakož i jeho schopnost léčby různých deficiencí kmenových buněk.

Předkládaný vynález poskytuje DNA sekvence, které obsahují: inkorporaci kodonů "výhodných" pro expresi vybranými nesavčími hostiteli; opatření míst pro štěpení restrikcními endonukleasovými enzymy a opatření dalšími počátečními, koncovými nebo intermediárními DNA sekvencemi, které umožňují konstrukci snadno exprimovatelných vektorů. Předkládaný vynález také poskytuje DNA sekvence, kodující polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 14, které se liší od přirozeně se vyskytujících forem ve shodnosti nebo umístění jednoho nebo více aminokyselinových zbytků (tj. deleční analogy, obsahující méně než všechny zbytky specifické

pro polypeptid s aminokyselinovou sekvencí podle obr. 14, substituční analogy, kde jeden nebo více specifických zbytků je nahrazeno jinými zbytky a adiční analogy, kde je ke koncové nebo střední části polypeptidu přidán jeden nebo více aminokyselinových zbytků) a které mají některé nebo všechny vlastnosti přirozeně se vyskytujících forem. Předkládaný vynález specificky poskytuje DNA sekvence, kodující plnou délku nezpracované aminokyselinové sekvence jakož i DNA sekvence, kodující zpracovanou formu polypeptidu podle vynálezu.

Nové DNA sekvence podle vynálezu zahrnují sekvence vhodné k zabezpečení exprese v prokaryotických a eukaryotických hostitelských buňkách polypeptidových produktů, majících alespoň část primární strukturní konformace a jednu nebo více biologických vlastností přirozeně se vyskytujícího SCF. DNA sekvence podle vynálezu specificky zahrnují: a) DNA sekvence uvedené na obr. 14B, 14C nebo jejich komplementární řetězce, b) DNA sekvence, které hybridizují (za podmínek hybridizace popsaných v příkladu 3 nebo za ještě přísnějších podmínek) na DNA sekvenci na obr. 14B a 14C nebo její fragmenty a c) DNA sekvence, které by hybridizovaly na DNA sekvenci na obr. 14B, 14C nebýt degenerace genetického kodu. Specificky, jsou to ty sekvence, které jsou uvedeny v části b) a c) genomické DNA sekvence, kodující alelické varianty SCF a/nebo kodující SCF z jiných savčích druhů a vyrobené DNA sekvence, kodující SCF, fragmenty SCF a analogy SCF. DNA sekvence mohou inkorporovat Kodony, usnadňující transkripci a translaci messengerové RNA v mikrobiálních hostitelích. Takové sekvence mohou být snadno konstruovány metodami podle Altona a spol., zveřejněná PCT přihláška WO 83/04053.

V souladu s jiným aspektem přeloženého vynálezu jsou zde popsány sekvence DNA, které kodují polypeptidy, mající SCF aktivitu, cenné pro poskytování informací, týkajících se aminokyselinové sekvence savčích proteinů, které dosud byly bezcenné. DNA sekvence jsou také cenné jako produkty užitečné při provádění široké škály syntéz SCF různými rekombinantními technikami. Použitím jiné metody jsou DNA sekvence poskytované vynálezem užitečné při generování nových a užitečných virových a cirkulárních plasmidových DNA vektorů, nových a užitečných transformovaných a transfektovaných prokaryotických a eukaryotických hostitelských buněk (zahrnujících bakteriální a kvasinkové buňky a kultivované savčí buňky) a nových a vhodných metodách kultivování takových hostitelských buněk schopných exprese SCF a od něho odvozených produktů.

DNA sekvence podle vynálezu jsou také vhodným materiálem pro značené sondy v izolaci lidské genomové DNA, kodující SCF a jiných genů pro tyto proteiny, jakož i cDNA a genomové DNA sekvence jiných savčích druhů. DNA sekvence mohou být také využity v různých alternativních metodách proteinové syntézy (např. ve hmyzích buňkách) nebo v genové terapii člověka nebo jiných savců. Předpokládá se, že DNA sekvence podle vynálezu jsou užitečné při vývoji transgenních savčích druhů, které mohou sloužit jako eukaryotičtí hostitelé pro produkci SCF a SCF produktů. Viz Palmiter a spol., Science 222, 809 až 814 (1983).

Předkládaný vynález poskytuje čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 14V a 14C (tj. čištěný z přírodního nebo vyrobený tak, že primární, sekundární a terciární konformace a glykosylační model jsou shodné s přirozeně se vyskytujícím materiálem),

jakož i přirozeně se nevyskytující polypeptid, mající strukturní konformaci (tj. konformaci sekvencí aminokyselinových zbytků) a glykosylaci dostatečně duplikativní s tímž u přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk, a tak dovolující hematopoetickou biologickou aktivitu přirozeně se vyskytujícího SCF. Takové polypeptidy zahrnují deriváty a analogy.

Ve výhodném provedení je SCF charakterizován jako produkt exprese v prokaryontním nebo eukaryontním hostiteli (tj. kultivovaných bakteriích, kvasinkách, buňkách vyšších rostlin, hmyzu nebo savčích buňkách) exogenních DNA sekvencí, získaných genomovým nebo cDNA klonováním nebo genovou syntézou. SCF je v preferovaném provedení "rekombinantní SCF". Produkty exprese obvykle ve kvasinkách (např. *Saccharomyces cerevisiae*) nebo prokaryotických (např. *E. coli*) hostitelských buňkách jsou prosté asociace s jinými savčími proteiny. Produkty exprese v buňkách obratlovců např. savců s výjimkou člověka (např. COS nebo CHO) a ptáků, jsou prosté asociace s jakýmikoliv lidskými proteiny. V závislosti na použitém hostiteli mohou být polypeptidy podle vynálezu glykosylovány savčími nebo jinými eukaryotickými karbohydráty nebo mohou být neglykosylovány. Hostitelská buňka může být změněna použitím techniky jako jsou ty, které jsou popsány Leeem a kol., *J. Biol. Chem.* 264, 13848 (1989), práce je zde uvedena jako odkaz. Polypeptidy podle vynálezu mohou také obsahovat iniciační methioninový aminokyselinový zbytek (v poloze 1).

Kromě přirozeně se vyskytujících alelových forem SCF předložený vynález také obsahuje další SCF produkty jako jsou polypeptidové analogy SCF. Takové analogy zahrnují fragmenty SCF. Postupy podle výše uvedené zveřejněné přihlášky Altona a

spol. (WO 83/04053) je možno snadno tvarovat a vyrobit kódující geny pro mikrobiální expresi polypeptidů, majících primární konformace, které se liší od zde specifikovaných v poměru shody a umístění jednoho nebo více zbytků (např. substitucí, terminální a intermediální adicí a delecí). Alternativně může být modifikace cDNA a genomických genů snadno dosaženo dobře známou místně řízenou mutagenezní technikou a být upotřebena ke generování analogů a derivátů SCF. Takové produkty mají alespoň jednu z biologických vlastností SCF, ale v ostatních se mohou lišit. Jako příklady zahrnují produkty podle vynálezu ty, které jsou zkráceny např. delecemi nebo ty, které jsou stabilnější k hydrolýze (a mohou proto mít zřetelnější nebo déle trvající efekty, než přirozeně se vyskytující); nebo které jsou změněny vypuštěním nebo přidáním jednoho nebo více potenciálních míst pro O-glykosylaci a/nebo N-glykosylaci. Kompetitivní antagoisté mohou být plně využity, například v případech nadprodukce SCF nebo v případech lidské leukemie, kde maligní buňky exprimují příliš receptorů pro SCF, jak indikuje přílišná exprese SCF receptorů v leukoblastech (příklad 13).

Pro použitelnost polypeptidových analogů podle vynálezu jsou uvedeny jejich imunologické vlastnosti u syntetických peptidů, které v podstatě duplikují aminokyselinovou sekvenci, existující v přirozeně se vyskytujících proteinech, glykoproteinech a nukleoproteinech. Specifičtěji, polypeptidy s relativně malou molekulovou hmotností mohou participovat v imunitní reakci, která je podobná průběhu a rozsahu s imunitními reakcemi fyziologicky významných proteinů jako jsou virové antigeny, polypeptidové hormony a podobně. Množství imunitních reakcí takových polypeptidů podněcuje formování specifických protilátek v imunologicky aktivních zvířatech

(Lerner a spol., Cell, 23, 309-310 (1981); Ross a spol., Nature, 294, 654-656 (1981); Walter a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 5197-5200 (1980); Lener a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, 3403-3407 (1981); Walter a spol., Proc. Natl.Acad.SCI.USA, 78, 4882-4886 (1981); Wong a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 5322-5326 (1982); Baron a spol., Cell, 28, 395-404 (1982); Dressman a spol., Nature, 295, 185 až 160 (1982) a Lerner, Scientific American, 248, 66-74 (1983). Viz také Kaiser a spol./Science, 223, 249.255 (1984) vzhledem k biologickým a imunologickým vlastnostem syntetických peptidů, které přibližně mají sekundární struktury peptidových hormonů, ale nemají jejich primární strukturní konformace.

Předložený vynález také zahrnuje tu třídu polypeptidů, kódovaných částí DNA komplementární k protein-kodujícímu řetězci lidské cDNA nebo genomické sekvence SCF, tj. "komplementární invertované proteiny" jak je popsáno Tramontanoem a spol., (Nucleic Acid.Res., 12, 5049-5059 (1984)).

SCF může být čištěn technikami známými v oboru. Je popsána metoda čištění SCF z SCF materiálu, jako jsou kondicionovaná media nebo lidská moč a serum. Metoda zahrnuje jeden nebo více následujících stupňů: podrobení materiálu, obsahujícího SCF iontovýměnné chromatografii (buď kationtovýměnné nebo aniontovýměnné chromatografii), zpracování materiálu, obsahujícího SCF dělením kapalinovou chromatografií s reverzní fází, zahrnující například imobilizovanou C₄ nebo C₆ pryskyřici; zpracování chromatografií s imobilizovaným lektinem, např. navázáním SCF na imobilizovaný lektin a elucí za použití cukru, který se

uchází o toto navázání. Detaily těchto metod budou zřejmé z popisů uvedených v příkladech 1, 10 a 11 pro čištění SCF. Techniky popsané v příkladu 2 Laiem a spol., US patent č. 4667016, který je zde uveden jako odkaz, jsou také vhodné pro čištění kmenového faktoru buněk.

Isoformy SCF jsou izolovány použitím standardních technik jako jsou techniky uvedené v US přihl.č. 42144 nazvané Erythropoietin Isoforma, podané 13.října 1989, která je zde uvedena jako odkaz (US patent č. 5.876.292).

Obsahem vynálezu jsou také farmaceutické kompozice, obsahující terapeuticky účinné množství polypeptidového produktu podle tohoto vynálezu spolu se vhodnými ředidly, ochrannými látkami, solubilizátory, emulgátory a přísadami a/nebo nosiči užitečnými v SCF terapii. "Terapeuticky účinné množství" je označeno množství, které poskytuje terapeutický efekt za daných podmínek a způsobu podávání. Takové kompozice jsou kapaliny nebo lyofilizované nebo jinak sušené přípravky a obsahují ředidla nebo různé pufrů (např. Tris-HCl, acetátový, fosfátový), pH a iontové síly, aditiva jako je albumin nebo želatina pro prevenci adsorpce na povrchy, detergenty (např. Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, soli kyseliny žlučové), solubilizační činidla (např. glycerol, polyethylenglykol), antioxidanty (např. kyselina askorbová, metabisulfit sodný), ochranné látky (např. Thimerosal, benzylalkohol, parabeny), botnací přísady nebo modifikátory tonicity (např. laktoza, mannitol), kovalentní připojení polymerů jako je polyethylenglykol k proteinu (popsáno v příkladu 12 dále), komplexace s kovovými ionty nebo inkorporace materiálu do nebo na partikulární přípravky polymerních složenin, jako je polymléčná kyselina, kyselina polyglykolová, hydrogely atd.

nebo do liposomů, mukroemulzí, micelů, jednovrstvých nebo vícevrstvých vehikulí, erytrocytových hostitelů nebo sferoplastů. Takové kompozice budou ovlivňovat fyzikální stav, rozpustnost, stabilitu, rychlost uvolňování in vivo a rychlost vylučování SCF in vivo. Výběr sloučeniny bude záviset na fyzikálních a chemických vlastnostech proteinu, majícího SCF aktivitu. Například produkt odvozený od membránově vázané formy SCF může vyžadovat přípravek, který obsahuje detergent. Přípravky s řízeným nebo postupným uvolňováním zahrnují prostředky s lipofilními depotními účinky (např. mastné kyseliny, vosky, oleje). V rozsahu vynálezu jsou také zahrnuty partikulární přípravky potažené polymery (např. poloxamery nebo poloxaminy) a SCF spojený s protilátkami vůči tkáňově specifickým receptorům, ligandům nebo antigenům nebo spojený s ligandy tkáňově specifických receptorů. Další provedení přípravků podle vynálezu zahrnují částicové formy, chránící potahy, inhibitory proteázy nebo látky, zvyšující permeaci při různých způsobech podání, zahrnujících podání parenterální, nasální a orální.

Vynález také zahrnuje přípravky, obsahující jeden nebo více hematopoetických faktorů jako je EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 a IGF-1, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 a LIF (faktor, inhibující leukemii).

Polypeptidy podle vynálezu mohou být "značeny" spojením s detekovatelnou markerovou substancí (např. radioaktivně značenou ^{125}I nebo biotinylovanou) pro poskytnutí činidel vhodných pro detekci a kvantifikaci SCF nebo jeho receptor nesoucích buněk v pevné tkáni a v kapalných vzorcích, jako je krev nebo moč.

Biotinylovaný SCF je užitečný ve spojení s imobilizovaným streptavidinem k čištění leukemických blastů z kostní dřeně v autologní transplantaci kostní dřeně. Biotinylovaný SCF je užitečný ve spojení s imobilizovaným streptavidinem k obohacení kmenových buněk v autologních nebo alogenních transplantacích kostní dřeně. Toxin napojený na SCF, jako je ricin (Uhr, Pro.Clin.Biol.Res.288, 403-412 (1989)), toxin difterie (Moolten, J.Natl.Con.Inst., 55, 473-477 (1975)) a radioisotopy vhodné pro přímou antineoplastickou terapii (příklad 13) nebo jako kondiční režim pro transplantaci kostní dřeně.

Produkty nukleových kyselin podle vynálezu jsou vhodné, jsou-li označeny detekovatelnými markery, jako jsou radioaktivní značkovače a neizotopové značkovače jako je biotin a využíváné v hybridizačním procesu k lokalizaci polohy lidského SCF genu a/nebo polohy některé takové genové rodiny na chromozomové mapě. Jsou také užitečné pro identifikaci porušení lidského SCF genu na úrovni DNA a použití jako genových markerů pro identifikaci sousedních genů a jejich porušení. Lidský gen pro SCF je kódován chromozomem 12 a myší SCF gen je mapován do chromozomu 10 při S1 lokusu.

SCF je užitečný samotný nebo v kombinaci s jinou terapií v léčbě množství poruch hematopoezy. SCF může být užit samostatně nebo s jedním nebo více dalšími hematopoetickými faktory jako je EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 a IGF-1, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 a LIF při léčbě hematopoetických chorob.

Existuje skupina poruch kmenových buněk, která je charakterizována redukcí funkce kostní dřeně způsobenou

toxickým, radiačním nebo imunologickým poškozením a který může být léčitelná SCF. Aplastická anemie je poškození kmenových buněk, při kterém je hematopoetická tkáň nahrazena tukem, a pancytopenie. SCF zvyšuje hematopoetickou proliferaci a je vhodný při léčbě aplastické anemie (příklad 8B). Steel myši byly použity jako modely lidské aplastické anemie (Jones, Exp.Hematol., 11, 571-580 (1983)). Slibné výsledky byly získány použitím cytokinu příbuzného GM-CSF v léčbě aplastické anemie (Antin a spol., Blood 70, 129a (1987)). Paroxysmální nocturální hemoglobiurie je porucha kmenových buněk, charakterizovaná formováním defektních destiček a granulocytů, jakož i abnormálních erytrocytů. Existuje mnoho chorob, které jsou léčitelné SCF. Patří se následující: myelofibroza, myeloskleróza, osteoporóza, metastatický karcinom, akutní leukemie, multiplikovaný myelom, Hodgkinova choroba, lymfom, Gaucherova choroba, Nieman-Pickova choroba, Letterer-Siwe choroba, neústupná erytoblastická anemie, Di Guglielmův syndrom, kongestivní splenomegalie, ~~Hodgkinova choroba~~, Kala azar, sarcoidosis, primární slezinná pancytopenie, miliární tuberkulóza, houbové choroby, septikemie, malárie, nedostatek vitamínu B₁₂ a kyseliny listové, nedostatek pyridoxinu, Diamond Blackfan anemie, hypopigmentační choroby, jako je vitiligo a piebaldismus. Erytroidy, megakaryocyty a granulocyty stimulující vlastnosti SCF jsou uvedeny v příkladech 8B a 8C.

Nárůst růstu nehematopoetických kmenových ^{něk}buňkách, jako jsou primordiální zárodečné buňky, melanocyty odvozené od zárodečného hřebenu, commisurální axony, pocházející ze hřbetní míchy, buňky krypt střeva, mesonefrické a metanefrické ledvinové tubuly a čichové bulby, je užitečný v situaci, kdy se na těchto místech vyskytuje poškození tkání. SCF je

užitečný pro léčbu neurologických poškození a je růstovým faktorem pro nervové buňky. SCF je užitečný během in vitro fertilizačního procesu nebo při léčení infertility. SCF je užitečný pro léčbu poškození střev radiací nebo chemoterapií.

Existují myeloproliferativní poškození kmenových buněk jako je polycythemia vera, chronické myelogenní leukemie, myeloidní metaplasie, primární trombocytomie a akutní leukemie, které je možno léčit SCF, anti-SCF protilátkami nebo konjugáty SCF-toxin.

Je zde množství případů, které dokumentují nárůst proliferace leukemických buněk podle hematopoetických růstových faktorů G-CSF, GM-CSF a IL-3 (Delwel a spol., Blood, 72, 1944-1949 (1988)). Protože úspěch mnoha chemoterapeutických léčiv závisí na faktoru, že neoplastické buňky cyklují aktivněji než normální buňky SCF, sám nebo v kombinaci s jinými faktory působí jako růstový faktor pro neoplastické buňky a senzibuje je k toxickému efektu chemoterapeutických léčiv. Nadprodukce SCF receptorů na leukoblastech je ukázána v příkladu 13.

Množství rekombinantních hematopoetických faktorů je podrobena zkoumání pro jejich schopnost snižovat leukocytovou hranici následkem chemoterapie a radiačního ošetření. Ačkoliv tyto faktory jsou velmi užitečné v tomto sestavení, je zde ranný hematopoetický kompartment, který je poškozen, zejména radiací a má být znovu vytvořen dříve, než tyto pozdně působící růstové faktory mohou projevit optimální akci. Použití SCF samotného nebo v kombinaci s těmito faktory podporuje snižování nebo eliminaci leukocytové destičkové hladiny z chemoterapie nebo radiační léčby. Navíc SCF dovolu-
je

intenzifikaci dávky v antineoplastickém nebo radiačním ošetření (příklad 19).

SCF je užitečný pro expresi ranných hematopoetických progenitorů v syngenních, alogenních nebo autologických transplantacích kostní dřeně. Použití hematopoetických růstových faktorů vykazuje snížení doby pro nahrazení neurofilů po transplantaci (Donahue a spol., Nature, 321, 872-875 (1986) a Elte a spol., J.Exp.Med., 165, 941-948 (1987)). Pro transplantaci kostní dřeně jsou používány následující tři scénáře samostatně nebo v kombinaci: dárce je léčen SCF samotným nebo v kombinaci s jiným hematopoetickým faktorem před aspirací kostní dřeně nebo periferní krevní leukoporesou pro zvýšení množství buněk vhodných pro transplantaci; kostní dřeň je léčena in vitro kvůli aktivaci nebo nárůstu počtu buněk před transplantací; nakonec je léčen příjemce kvůli zvýšení schopnosti přijmout dřeň dárce.

SCF je užitečný pro zvýšení schopnosti genové terapie založené na transfekci (nebo infekci retrovirovým vektorem) hematopoetických kmenových buněk. SCF dovoluje kultivaci a multiplikaci ranných hematopoetických kmenových buněk, které mají být transfektovány. Kultivace může být provedena se samotným SCF nebo jeho kombinací s IL-6, IL-3 nebo oběma. Po transfekci jsou pak tyto buňky zavedeny do kostní dřeně transplantované do pacienta, trpícího genetickou poruchou (Lim, Proc.Natl.Acad.Sci., 86, 8892-8896 (1989)). Příklady genů, které jsou vhodné pro léčbu genetických poškození jsou adenosindeamináza, glukocerebrosidáza, hemoglobin a cystická fibroza.

SCF je užitečný pro léčbu syndromu získané

imunodeficiencie (AIDS) nebo několika kombinovaných imunodeficitních stavů (SCID) samotný nebo v kombinaci s jinými faktory jako je IL-7 (viz příklad 7). Ilustrací těchto účinků je schopnost SCF léčby zvýšit absolutní hladinu cirkulujících T-helper (CD4⁺, CKT4⁺) lymfocytů. Tyto buňky jsou primárním buněčným cílem viru lidské imunodeficiencie (HIV), což vede k imunodeficientnímu stavu AIDS pacientů (Montagnier v Human T-Cell/Lymphoma Virus, vyd. R.C.Gallo, Gold Spring Harbor, New York, 369-379 (1984)). Navíc je SCF užitečný při potlačení myelosupresivního účinku anti-HIV léčiv jako je AZT (Gogu Life Sciences, 45, č. 4 (1989)).

SCF je užitečný pro zvýšení hematopoetické náhrady po akutní ztrátě krve.

Při léčbě in vivo je SCF užitečný pro povzbuzení imunitního systému pro boj s neoplasií (rakovinou). Příklad terapeutické schopnosti přímého zvýšení imunitní funkce nově klonovaným cytokinem (IL-2) je popsán Rosenbergem a spol., N.Eng.J.Med., 313 1485 (1987).

Podávání SCF s jinými činidly jako je jeden nebo více hematopoetických faktorů se provádí v určitých časových intervalech nebo jsou podávány společně. Předchozí léčba SCF rozšiřuje progenitorovou populaci, která odpovídá koncově-funkčním hematopoetickým faktorům jako je G-CSF nebo EPO. Způsob podávání může být intravenózní, intraperitoneální, subkutánní nebo intramuskulární.

Předložený vynález se také týká protilátek, které specificky vážou faktor kmenových buněk. Příklad 7, který je uveden dále, popisuje produkci polyklonálních protilátek.

Dalším využitím vynálezu jsou monoklonální protilátky, které specificky vážou SCF (viz příklad 20). Oproti konvenčním protilátkovým (polyklonálním) preparátům, které obvykle obsahují různé protilátky řízené proti různým determinantům (epitopům), každá monoklonální protilátka je řízena proti jednomu determinantu na antigenu. Monoklonální protilátky jsou užitečné pro zlepšení selektivity a specifity diagnostických a analytických zkušebních metod, využívajících vazby antigen-protilátka. Také jsou používány k neutralizaci nebo nahrazení SCF ze sera. Druhá výhoda monoklonálních protilátek je ta, že mohou být syntetizovány hybridními buňkami v kultuře nekontaminované jinými imunoglobuliny. Monoklonální protilátky mohou být připraveny ze supernatantu kultivovaných hybridomových buněk nebo z ascitu indukovaného naočkováním buněk hybridomů intraperitoneálně myši. Technika hybridomů popsaná původně Köhlerem a Milsteinem (Eur.J.Immunol.6, 511-519 (1976)) byla aplikována v širokém rozsahu pro produkci hybridních buněčných linií, které produkují vysoké hladiny monoklonálních protilátek proti specifickým antigenům.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady slouží k ilustraci předloženého vynálezu a v žádném případě jej nikterak neomezují.

Příklad 1

Čištění/charakteristika faktoru kmenových buněk z media získaného z jater krys Buffalo

A. Biologická zkouška in vitro

1. Zkouška HPP-CFC

Různé biologické aktivity mohou být vlastní přirozenému savčímu krysímu SCF jakož i rekombinantnímu SCF proteinu. Jednou takovou aktivitou je jeho působení na ranné hematopoetické buňky. Tato aktivita může být měřena ve zkoušce High Proliferative Potential Colony Forming cell (HPP-CTC)/Zsebo a spol., supra (1988)). Pro hodnocení účinnosti faktorů na ranné hematopoetické buňky využívá HPP-CFC zkušební systém myši kostní dřeň získanou ze zvířat 2 dny po léčbě 5-fluoruracilem (5-FU). Chemoterapeutické léčivo 5-FU selektivně vyčerpává pozdní hematopoetické progenitory s následující detekcí ranných progenitorových buněk a proto faktory, které působí na takové buňky jsou přínosem. Krysí SCF je umístěn na plotny za přítomnosti CSF-1 nebo IL-6 v polopevné agarové kultuře. Agarová kultura obsahuje kompletní McCoy-ovo medium (GIBCO), 20 % fetálního hovězího sera, 0,3 % agaru a 2×10^5 buněk kostní dřeně/ml. McCoyovo kompletní medium obsahuje následující složky: 1 x McCoyovo medium doplněné 0,1 mM pyruvátu, 0,24 x esenciálními aminokyselinami, 0,24 x neesenciálními aminokyselinami, 0,027 %

hydrogenuhličitanu sodného, 0,24 x vitaminů, 0,72 mM glutaminu, 25 µg/ml L-serinu a 12 µg/ml L-asparaginu. Buňky kostní dřeně byly získány z Balb/c myši injikovaných i.v. 150 mg/kg 5-FU. Femury se odeberou 2 dny po léčbě 5-FU myši a kostní dřeň se vybere. Červené krvinky se lyzují s činidlem, lyzujícím buňky červených krvinek (Becton Dickenson) před umístěním na plotny. Testované substance se umístí na plotny s výše uvedenou směsí ve 30 mm jamkách. O čtrnáct dní později jsou spočteny kolonie (> 1 mm v průměru), které obsahují tisíce buněk. Tato zkouška je používána všude pro čištění SCF z krysích přirozených buněk.

V obvyklé zkoušce krysí SCF způsobuje proliferaci přibližně 50 HPP-CFC ze 20000 buněk na plotně. Krysí SCF má synergistickou aktivitu na buňky myši kostní dřeně léčené 5-FU; HPP-CFC kolonie se nevytvářejí v přítomnosti samotných faktorů, ale v této zkoušce je aktivní kombinace SCF a CSF-1 nebo SCF a IL-6.

2. MC/9 zkouška

Jiná užitečná biologická aktivita přirozeně získaného a rekombinantního krysího SCF je schopnost způsobovat proliferaci na IL-4 závislé "mast cell" linie, MC/9 (ATCC CRL 8306). MC/9 buňky jsou kultivovány se zdrojem IL-4 v souladu s ATCC CRL 8306 protokolem. Medium použité v biozkoušce je RPMI 1640, 4 % fetálního hovězího sera, 5×10^{-5} M 2-merkapttoethanolu a 1x glutamin-pen-strep. MC/9 buňky proliferují jako odezva na SCF bez potřeby jiných růstových faktorů. Tato proliferace je měřena první kultivací buněk po 24 hodin bez růstových faktorů, umístěním 5000 buněk v každé jamce plotny s 96 jamkami s testovaným vzorkem po 48 hodin,

zpracováváním po 4 hodiny 0,5 μCi ^3H -thymidinem (specifická aktivita 20 Ci/mmol), získáním roztoku na filtrech ze skleněných vláken a pak měřením specificky navázané radioaktivity. Zkouška byla použita pro čištění savčích buněk odvozených od krysího SCF po stupni ACA gelové filtrace, sekci C2 tohoto příkladu. SCF působí 4 až 10násobné zvýšení CPM proti základu.

3. CFU-GM

Byla zjišťována akce čištěného savčího SCF jak přirozeně získaného tak rekombinantního, bez interferujících kolonie stimulujících faktorů (CSF) na normální nevyčerpané kostní dřeni. CFU-GM zkouška (Broxmeyer a spol., Exp.Hematol., 5, 87 (1977)) je použita ke zhodnocení účinku vlivu SCF na normální dřev. Stručně - všechny buňky kostní dřene po lýzi červených krvinek, jsou umístěny na plotny v polopevné agarové kultuře, obsahující testovanou substanci. Po 10 dnech jsou spočítány kolonie, obsahující skupiny více než 40 buněk. Agarová kultura může být usušena na skleněných podložkách a specifickým biologickým barvivem může být určena morfologie buněk.

Na normální myší kostní dřeni byl čištěný savčí krysí SCF pluripotentní CSF, stimulující růst kolonií, obsahujících nezralé buňky, neurofily, makrofágy, eosinofily a megakaryocyty, bez potřeby dalších faktorů. Ze 200000 buněk umístěných na plotně vyrostlo během 10 dnů přes 100 kolonií. Jak krysí tak lidský rekombinantní SCF stimuluje produkci erytroidních buněk v kombinaci s EPO, viz příklad 9.

B. Kondicionované medium

Jaterní buňky krysy Buffalo (BRL) z American Type Culture Collection (ATCC CRL 1442), vyrůstaly na mikronosičích ve 20litrovém perfuzním kultivačním systému pro produkci SCF. Tento systém využívá Biolafitte fermentor (Model ICC-20) s výjimkou sít používaných pro zadržení mikronosičů a oxidačních trubiček. 75mikrometrová síťka jsou zabezpečována před ucpáním mikronosiči periodickým zpětným proplachováním dosaženým systémem řízených ventilů a počítačem řízených čerpadel. Každé síto alternativně pracuje jako přívod media a výchozí síto. Oscilující vyvolaný tok tak zabezpečuje, že se síta neucpávají. Pkysličení je zajišťováno vinutými silikonovými přívody (50 stop délka, 0,25 palců vnitřní průměr, 0,03 palců stěna). Růstové médium použité pro kultivaci BRL 3A buněk bylo minimální základní médium (s Earleovými solemi) (GIBCO), 2 mM glutaminu, 3 g/l glukózy, fosfát tryptózy (2,95 g/l), 5 % fetálního/ovězího séra a 5 % fetálního telecího séra. Získané médium bylo identické s výjimkou vynechání séra. Reaktor, obsahující Cytodex 2 mikronosiče (Pharmacia) v koncentraci 5 g/l byl očkovan 3 x 10⁹ BRL CA buněk rostlých ve válcovitých nádobách a přenesených trypsinizací. Buňky byly ponechány pro připojení a růst na mikronosičích po osm dnů. Růstové médium bylo perfundováno reaktorem v závislosti na spotřebě glukózy. Koncentrace glukózy byla udržována na přibližně 1,5 g/l. Po osmi dnech byl reaktor perfundován šesti objemy media prostého séra pro odstranění většiny séra (koncentrace proteinu < 50 µg/l). Reaktor byl pak vsádkově provozován dokud koncentrace glukózy neklesla ^{na 1,2 g/l} ~~POD 1 g/l~~. Od tohoto bodu pracoval reaktor v kontinuální perfúzní rychlosti asi 10 l/den. pH kultury bylo udržováno na 6,9 ± 0,3 úpravou rychlosti průtoku CO₂. Rozpuštěný kyslík byl udržován na více než 20 % sycením vzduchem a pokud je to potřebné, doplňováním čistým kyslíkem. Teplota byla udržována na 37 ± 0,5 °C.

Z výše uvedeného systému bylo získáno přibližně 336 litrů kondicionovaného media prostého séra, ^{kteře} bylo použito jako výchozí materiál pro čištění přirozeného ze savčích buněk získaného krysího SCF.

C. Čištění

Všechny práce zaměřené na čištění byly prováděny při 4 °C pokud není uvedeno jinak.

1. Aniontovýměnná chromatografie na DEAE-celuloze

Kondicionované medium získané ze séra prosté kultivace BRL 3A buněk bylo čištěno filtrací přes 0,45 μ m Sartocapsules (Sartorius). Několik různých podílů (4l l, 27 l, 39 l, 30,2 l, 37,5 l a 16l l) bylo odděleně zahuštěno, zpracováno výměnou diafiltrace/pufr a aniontovýměnnou chromatografií na DEAE-celulóze, stejným postupem pro každý podíl. DEAE-celulóзовые pooly pak byly spojeny a zpracovány dále jako jeden podíl v sekci C2-5 tohoto příkladu. Pro ilustraci, zpracování 4l bylo následující. Filtrované kondicionované medium bylo zahuštěno na ~700 ml za použití ultrafiltračního zařízení s tangenciálním tokem Millipore Pellicon s kazetou dělicí polysulfonové membrány 10000 mol.hmotnost (20 stop² celková plocha membrány; rychlost toku ~1095 ml/min a filtrační rychlost 250 až 315 ml/min). Defiltrační/pufrová výměna při přípravě pro aniontovýměnnou chromatografii byla provedena přidáním 500 ml 50 mM tris-HCl, pH 7,8 ke koncentrátu, znovu bylo zahuštěno na 500 ml za použití ultrafiltračního zařízení s tangenciálním tokem a toto bylo opakováno šestkrát. Zahuštěný/diafiltrovaný přípravek byl nakonec získán v objemu 700 ml. Přípravek byl aplikován na

sloupec aniontovýměnné DEAE-celulózy (5 x 20,4 cm, Whatman DE-52 pryskyřice), která byla ekvilibrována 50 mM tris-HCl, pH 7,8 pufrém. Po aplikaci vzorku byl sloupec promyt 2050 ml tris-HCl pufru a solným gradientem (0 až 300 mM NaCl v tris-HCl pufru, 4 l celkový objem). Frakce 15 ml byly odebírány za rychlosti průtoku 167 ml/h. Chromatografie je uvedena na obr. 1. HPP-CFC počet kolonií odpovídá biologické aktivitě ve zkoušce HPP-CFC; bylo zkoumáno 100 μ l z indikovaných frakcí. Frakce odebrané během aplikace vzorku a vymyté nejsou uvedeny na obrázku, v těchto frakcích nebyla prokázána žádná biologická aktivita.

Chování všech podílů kondicionovaného media, podrobených zahuštění, výměně diafiltrace/pufr a aniontovýměnné chromatografii bylo stejné. Koncentrace proteinu ve všech podílech, stanovená metodou podle Bradforda (Anal.Biochem.72, 248-254 (1976)) s hovězím sérovým albuminem jako standardem byly v rozmezí 30 až 50 μ g/ml. Celkový objem kondicionovaného media použitého v této přípravě byl 336 l.

2. ACA 54 gelová filtrační chromatografie

Frakce, mající biologickou aktivitu se zpracování na sloupcích DEAE-celulóza pro každých šest podílů kondicionovaného média uvedených výše (například frakce 87-114 uvedené na obr. 1) byly spojeny (celkový objem 2900 ml) a zahuštěny na celkový objem 74 ml za použití míchaných zařízení Amicon a YM10 membrán. Tento materiál byl aplikován na ACA 54 (LKB) gelový filtrační sloupec (obr. 2) ekvilibrovaný v 50 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,4. Frakce o objemu 14 ml byly odebírány při průtokové rychlosti 70 ml/h. Díky inhibičním faktorům koeluovaným s aktivními frakcemi, se pík aktivity

(počet HPP-CFC sloupec) jeví rozštěpený; nicméně vzhledem k předchozím chromatogramům, aktivita koeluuje se hlavním proteinovým píkem, a proto byl připraven jeden pool frakcí.

3. Chromatografie na agarose s aglutininem z pšeničných klíčků

Frakce 70-112 z gelové filtrace na sloupci ACA 54 byly spojeny (500 ml). Pool byl rozdělen na polovinu a každá polovina byla zpracována chromatografií na sloupci agarozy s aglutininem z pšeničných klíčků (5 x 24,5 cm, pryskyřice od E-Y Laboratories, San Mateo, CE; aglutinin ze pšeničných klíčků rozpoznává určité karbohydrátové struktury) ekvilibrovaným ve 20 mM tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,4. Po aplikacích vzorku byl sloupec promyt asi 2200 ml pufru sloupce a eluce vázaného materiálu pak byla provedena aplikací roztoku 350 mM N-acetyl-D-glukosaminu rozpuštěného v pufru sloupce, při počátku u frakce -210 na obr. 3. Frakce 13,25 ml byly odebírány při rychlosti průtoku 122 ml/h. Průběh jedné chromatografie je uveden na obr. 3. Podíly frakcí určených pro zkoušení byly dialyzovány vůči fosfátem pufrovanému salinickému roztoku; 5 µl dialyzovaných materiálů bylo umístěno do MC/3 zkoušky (cpm hodnoty na obr. 3) a 10 µl do HPP-CFC zkoušky (číselné hodnoty kolony na obr. 3). Je zřejmé, že aktivní materiál vázaný na kolonu byl pak eluován N-acetyl-D-glukosaminem, přičemž kolonou během aplikace vzorku a promývání prošel kontaminující materiál.

4. Kationtovýměnná chromatografie na S-Sepharose s rychlým průtokem

Frakce 211 až 225 z chromatografie na agarose s aglutininem z pšeničných klíčků, uvedené na obr. 3 a

ekvivalentní frakce ze druhého pokusu byly spojeny (375 ml) a dialyzovány proti 25 mM mravenčanu sodného, pH 4,2. Pro minimalizování doby vystavení účinku nízkého pH, byla dialýza prováděna během období 8 h proti 5 l pufru, se čtyřmi změnami během 8hodinového období. Na konci tohoto dialyzačního období byl objem vzorku 480 ml a pH a vodivost vzorku byly blízké těmto hodnotám dialyzačního pufru. Během dialýzy se objevil ve vzorku vysrážený materiál. Tento byl odstraněn odstředěním při 22000 g po dobu 30 min a supernatant z odstředěného vzorku byl aplikován na kolonu kationtové výměny s rychlým průtokem (3,3 x 10,25 cm; pryskyřice fy Pharmacia), která byla ekvilibrována v pufru - mravenčanu sodném. Rychlost průtoku byla 465 ml/h a byly odebírány frakce 14,2 ml. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 240 ml pufru a eluce navázaného materiálu byla provedena aplikací gradientu 0-750 mM NaCl (NaCl rozpuštěný v pufru pro kolonu, celkový objem gradientu 2200 ml), počátek u frakce -45 na obr. 4. Eluční profil je uveden na obr. 4. Spojené frakce byly upraveny na pH 7 až 7,4 přidáním 200 μ l 0,97 mM tris báze. Čpm na obr. 4 se týká výsledků získaných v MC/9 biologické zkoušce; podíly indikovaných frakcí byly dialyzovány proti fosfátem pufrovanému salinickému roztoku a byly použity v množství 20 μ l pro tuto zkoušku. Z obr. 4 je zřejmé, že hlavní podíl biologicky aktivního materiálu prošel kolonou nenavázaný, zatímco se kontaminující materiál navázal a byl eluován v solném gradientu.

5. Chromatografie, používající uhlovodíkové pryskyřice navázané na oxidu křemičitém

Frakce 4 až 40 z kolony S-Sepharosy na obr. 4 byly spojeny (540 ml). 450 ml tohoto poolu bylo spojeno se stejným objemem pufru B (10 mM octanu amonného, pH 6 : isopropanol) a

aplikováno průtokovou rychlostí 540 ml/h na C₄ kolonu (Vydac Proteins c₄, 2,4 x 2 cm) ekvilibrovanou pufrem A (60 mM octan amonný, pH 6 : isopropanol, 62,5:37,5). Po aplikaci vzorku byla průtoková rychlost snížena na 154 ml/h a kolona byla promyta 200 ml pufru. Pak byl aplikován lineární gradient od pufru A k pufru B (celkový objem 140 ml) a byly odebírány frakce 9,1 ml. Podíly poolu z chromatografie na S-Sepharose, výchozí vzorek z kolony C₄, souhrn poolu a promytý pool byly upraveny na 40 µg/ml hovězího sérového albuminu přidáním vhodného objemu zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml a dialyzovány proti fosfátem pufrovanému salinickému roztoku pro přípravu biologické studie. Podobně byly 40 µl podíly gradientových frakcí spojeny s 360 µl fosfátem pufrovaného salinického roztoku, obsahujícího 16 µg hovězího serového albuminu a tyto byly pak dialyzovány proti fosfátem pufrovanému salinickému roztoku pro přípravu biologické studie. Tyto různé frakce byly zkoušeny MC/9 zkouškou (6,3 µl podíly připravených gradientových frakcí, cpm na obr. 5). Výsledky zkoušky také ukazují, že asi 75 % získané aktivity bylo v souhrnných a promytých frakcích a 25 % v gradientových frakcích jak je uvedeno na obr. 5. SDS-PAGE (Laemmli, Nature, 227, 680-685 (1970)); zásobní gely obsahují 4 % (hmotn./obj.) akrylamidu a dělicí gely obsahují 12,5 % hmotn./obj.) akrylamidu) podílů různých frakcí je uvedena na obr.6. pro gelové zpracování byly podíly vzorků sušeny za vakua a pak znovu rozpuštěny za použití 20 µl vzorku ošetřeného pufrem (neredukujícím, tj. bez 2-merkapt ethanolu) a vařeny 5 minut před nanesením na gel. Dráhy A a B představují výchozí kolonový materiál (75 µl z 890 ml) a materiál prošlý kolonou (75 µl z 880 ml), číslované značky na levé straně obr. představují migrační polohy (redukované) markerů, majících molekulovou hmotnost 10³krát větší než indikované hodnoty, kde

markery jsou fosforyláza B (M_r 97400), hovězí sérový albumin (M_r 66700), ovalbumin (M_r 42700), karboanhydráza (M_r 31000), inhibitor trypsinu sojových bobů (M_r 21500) a lysozym (M_r 14400), dráhy 4 až 9 představují odpovídající frakce odebrané během aplikace gradientu (60 μ l z 9,1 ml). Gel byl postříbřen (Morrissey, Anal.Biochem., 117, 307-310 (1981)). Ze srovnání drah A a B je zřejmé, že hlavní část barveného materiálu prošla kolonou. Obarvený materiál ve frakcích 4 až 6 v oblasti uvedené výše a pod M_r 31000 polohou standardu odpovídá biologické aktivitě detekované ve frakcích gradientu (obr. 5) a představuje biologicky aktivní materiál. Je třeba poznamenat, že tento materiál je vizualizován ve drahách 4 až 6, ale ne ve drahách A a/nebo B, protože byl mnohem větší podíl celkového objemu (0,66 % celkového objemu frakcí 4 až 6 versus 0,0084 % celkového objemu pro dráhy A a B) použit pro zpracování. Frakce 4 až 6 z této kolony byly spojeny.

Jak je uvedeno výše, přibližně 75 % získané aktivity prošlo C_4 kolonou, obr. 5 Tento materiál byl rechromatografován za použití C_4 pryskyřice v podstatě popsané výše s tím rozdílem, že byly použity větší kolony (1,4 x 7,8 cm) a nižší průtoková rychlost (50 až 60 ml/h). Přibližně 50 % získané aktivity bylo v průtoku a 50 % ve frakcích gradientových, vykazujících podobný průběh SDS-PAGE jako aktivní gradientové frakce na obr. 6. Aktivní frakce byly spojeny (29 ml).

Analytická C_4 kolona byla provedena v podstatě jak je uvedeno výše a frakce byly zkoušeny oběma biozkouškami. Jak je uvedeno na obr. 7 frakce z analytické kolony koeluovaly jak MC/9 tak HPP-CFC bioaktivity. SDS-PAGE analýza (obr. 8) odhaluje přítomnost M_r -31000 proteinu ve frakcích z kolony,

které obsahují biologickou aktivitu v obou zkouškách.

Aktivní materiál v píku druhé (relativně malé) aktivity zřejmý v S-Sepharosové chromatografii (tj. obr. 4, frakce 62 až 72), časnější frakce v solném gradientu) byl také čištěn C₄ chromatografií. Vyzkazuje stejné chování při SDS-PAGE a měl stejné N-terminální aminokyselinové sekvence (viz příklad 20) jako materiál získaný C₄ chromatografií na frakcích prošlých S-Sepharosou.

6. Shrnutí čištění

Shrnutí stupňů čištění popsaných ve stupních 1 až 5 výše je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2

Shrnutí čištění savčích SCF

Stupeň	celkem	
	objem (ml)	protein (mg) ⁵
kondicionované médium	335,700	13,475
DEAE celulóza ¹	2,900	2,164
ACA-54	550	1,513
aglutinin/pšeničných klíč- ků-agaróza ²	375	431
S-Sepharose	540 ⁴	10
C ₄ -pryskyřice ³	57,3	0,25-0,40 ⁶

1. Uvedené hodnoty představují souhrn hodnot z různých vsádek popsaných v textu.
2. Jak je popsáno výše v příkladu, vysrážený materiál, který

se objevil během dialýzy vzorku v přípravě pro S-Sepharosovou chromatografii byl odstraněn odstředěním. Vzorek po odstředění (480 ml) obsahoval 264 mg celkového proteinu.

3. Kombinace aktivních gradientových frakcí ze dvou pokusů na C₄ kolonách v sekvenci jak je popsáno.
4. Pouze 450 ml tohoto materiálu bylo použito pro následující stupeň (tento příklad, výše).
5. Stanoveno metodou podle Bradforda (výše, 1976) pokud není uvedeno jinak.
6. Hodnoceno podle intenzity potažení stříbrem po SDS-PAGE a podle analýzy aminokyselin jak je popsáno v sekci K příkladu 2.

D. SDS-PAGE a zpracování glykosidázou

SDS-PAGE spojeného gradientu frakcí ze dvou pokusů na koloně C₄ ve velkém měřítku jsou uvedeny na obr. 9. 60 μ l poolu z první C₄ kolony v pokuse bylo použito (dráha 1), a 40 μ l poolu ze druhé C₄ kolony (dráha 2). Tyto gelové dráhy byly postříbřeny. Markery molekulové hmotnosti byly jak je popsáno u obr. 6. Jak bylo uvedeno, materiál migrující nad a pod M_r 31000 markerovou polohu představuje biologicky aktivní materiál; zřejmá heterogenita je většinou způsobena heterogenitou ve glykosylaci.

Pro charakterizaci glykosylace byl čištěný materiál jodován pomocí ¹²⁵I, zpracován s různými glykosidázami a analyzován pomocí SDS-PAGE (redukční podmínky) autoradiografií. Výsledky jsou uvedeny na ob. 9. Dráhy 3 a 9, ¹²⁵I-značený materiál bez jakéhokoliv ošetření glykosidázou. Dráhy 4 až 8 představují ¹²⁵I-značený materiál ošetřený

glykosidázou následujícím způsobem. Dráha 5 neuraminidázou a O-glykanázou. Dráha 6 N-glykanázou. Dráha 7 neuraminidázou a N-glykanázou. Dráha 8 neuraminidázou, O-glykanázou a N-glykanázou. Podmínky byly 5 mM 3-/(3-cholamidopropyl)dimethylamonio/-1-propansulfonát (CHAPS), 33 mM 2-merkптоethanol, 10 mM tris-HCl, pH 7-7,2 po 3 h při 37 °C. Neuraminidáza (z *Arthobacter ureafaciens*, Calbiochem) byla použita v konečné koncentraci 0,23 jednotek/ml. O-Glykanáza (Genzym, endo-alfy-N-acetyl-galaktosaminidáza) byla použita v koncentraci 45 milijednotek/ml. N-Glykanáza (Genzym, peptid; N-glykosidáza F; peptid-N⁴/N-acetyl-beta-glukosaminy/aspargin amidáza) byla použita v koncentraci 10 jednotek/ml.

Stejné výsledky jako na obr. 9 byly získány při zpracování neznačeného čištěného SCF glykosidázou a vizualizací produktu postřípením na SDS-PAGE.

Příležitostně byly provedeny různé kontrolní inkubace. Tyto zahrnují: inkubaci ve vhodném pufru, ale bez glykosidázy, pro ověření, že výsledky byly získány působením přidaného glykosidázového přípravku; inkubace s glykosylovaným proteinem (tj. například glykosylovaný rekombinantní lidský erythropoietin) známým jako substrát pro glykosidázu, pro ověření, že použitý glykosidázový enzym byl aktivní; a inkubace s glykosidázou ale bez substrátu, pro ověření, že glykosidáza samotná nevytváří pruhy na vizualizovaném gelu.

Ošetření glykosidázou byla také provedena s endo-beta-N-acetylglukosamidázou (endo F; NEN Dupont) a s endo-beta-N-acetylglukosaminidázou H (endo H, NEN Dupont),

vždy se vhodnými kontrolními inkubacemi. Podmínky ošetření s endo F byly: var 3 min za přítomnosti 1 % (hmotn./obj.) SDS, 100 mM 2-merkaptoethanolu, 100 mM EDTA, 320 mM fosfát sodný, pH 6, následovaný 3-násobným zředěním s Nonidatem P-40 (1,17 %, obj./obj., konečná koncentrace), fosfát sodný (200 mM, konečná koncentrace) a endo F (7 jednotek/ml, konečná koncentrace). Podmínky endo H ošetření byly stejné s tou výjimkou, že SDS koncentrace byla 0,5 % (hmotn./obj.) a endo H byla použita v koncentraci 1 µg/ml. Výsledky s endo F byly stejné jako s N-glykanázou, zatímco endo H byla na čištěném SCF materiálu neúčinná.

Závěry, které lze z výsledků odvodit, jsou popsány dále pro pokusy s glykosidázou. Různá ošetření s N-glykanázou (která odstraňuje jak komplex tak vysoce manosový N-zesítený karbohydrát (Tarentino a spol., Biochemistry 24, 4665-4671)(1985)), endo F (působící stejně jako N-glykanáza (Elder a Alexander, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 4540-4544 (1982))), endo H (odstraňující jak vysokou manosu tak určitý hybridní typ N-zesíteného karbohydrátu (Tarentino a spol., Methods Enzymol. 50C, 574-580 (1978)), neuraminidázou (odstraňující zbytky sialové kyseliny) a O-glykanázou (odstraňující určité O-zesítené karbohydráty (Lambin a spol., Biochem.Soc.Trans.12, 599-600 (1984)) potvrzují, že: jsou přítomny jak N-zesítené tak O-zesítené karbohydráty, největší podíl N-zesíteného karbohydrátu je komplexního typu a je přítomna sialová kyselina, kde alespoň část je ve formě O-zesítených skupin. Některé údaje o možných místech N-zesítení mohou být získány z aminokyselinových sekvenčních údajů (příklad 2). Skutečnost, že ošetření N-glykanázou, endo F a N glykanázou/neuraminidázou může převést heterogenní materiál jak je zřejmé podle SDS-PAGE na rychle migrující

formy, které jsou homogennější, je v souladu se závěrem, že všechny materiál představuje stejný polypeptid, s heterogenitou způsobenou heterogenitou při glykosylaci. Je také pozoruhodné, že nejmenší formy získané kombinovanými ošetřeními s různými glykosylázami, jsou v rozmezí M_r 18000 až 20000 vzhledem k markerům hmotnosti použitým v SDS-PAGE..

Potvrzení, že difúzně migrující materiál kolem polohy M_r 31000 na SDS-PAGE představuje biologicky aktivní materiál, který má stejný polypeptidový řetězec, je dáno skutečností, že aminokyselinové sekvenční údaje získané z materiálu migrujícího v této oblasti (např. po elektroforetickém transferu a ošetření bromkyanem, příklad 2) odpovídají těm, které byly demostrovány pro izolovaný gen, jehož exprese rekombinantní DNA vede k biologicky aktivnímu materiálu (příklad 4).

Příklad 2

Aminokyselinová sekvenční analýza savčího SCF

A. Vysoce účinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (HPLC) čištěného proteinu

Přibližně 5 μ g SCF čištěného jako v příkladu 1 (koncentrace = 0,117 mg/ml) se podrobí HPLC s reverzní fází za použití C_4 úzké kolony (Vydac, otvor 300 Å, 2 mm x 15 cm). Protein byl eluován lineárním gradientem 97% mobilní fáze A (0,1% trifluoroctová kyselina)/3% mobilní fáze B (90 % acetonitrilu v 0,1% trifluoroctové kyselině) do 30% mobilní fáze A/70 % mobilní fáze B během 70 min s následující isokratickou elucí po dalších 10 minut při průtokové rychlosti

0,2 ml za min. Po odečtení slepého chromatogramu pufru se SCF jeví jako jednotlivý symetrický pruh (pík) s retenčním časem 70,05 min jak je uvedeno na obr. 10. Za těchto podmínek nebyl detegován žádný hlavní pík kontaminujícího proteinu.

B. Sekvenování elektroforeticky transferovaných proteinových pruhů

SCF čištěný jako v příkladu 1 (0,5 až 1,0 mmol) se následujícím způsobem ošetří N-glykanázou, enzymem, který specificky štěpí Asn-zesítné karbohydrátové skupiny kovalentně připojené k proteinům (viz příklad 1D). Šest ml poolovaného materiálu ze frakcí 4 až 6 z C₄ kolony na obr. 5 se suší za vakua. Pak se přidá 150 μ l 14,25 mM CHAPS, 100 mM 2-merkapttoethanolu, 335 mM fosforečnanu sodného, pH 8,6 a inkubace se provádí 95 minut při 37 °C. Přidá se 300 μ l 74 mM fosforečnanu sodného, 15 jednotek/ml N-glykanázy, pH 8,6 a v inkubaci se pokračuje 19 h. Vzorek se pak zpracuje na 9–18% SDS-polyakrylamidovém gradientovém gelu (0,7 mm tloušťka, 20 x 20 cm). Proteinové pruhy v gelu se elektroforeticky přenesou do polyvinylidifluoridu (PVDF, Milipore Corp.) za použití 10 mM Caps pufru (pH 10,5) při konstantním proudu 0,5 A po 1 h (Matsudaira, J.Biol.Chem., 261, 10035–10038 (1987)). Přenesené proteinové pruhy se vizualizují pomocí Coomassie Blue. Pruhy jsou přítomny při M_r -29000–33000 a M_r - 26000, tj. deglykosylace byla jen částečná (příklad 1D, obr. 9); dřívější pruh představuje neštěpený materiál a pozdější představuje materiál, ze kterého je odstraněn N-zesítný karbohydrát. Pruhy byly vyříznuty a přímo vloženy (40% pro M_r 29000–33000 proteinu a 80% pro M_r 26000 proteinu) na proteinový sekvenátor (Applied Biosystems Inc., model 477). Analýza^a proteinové sekvence byla provedena za použití programů doporučených

výrobce (Hewick a spol., J.Biol.Chem., 256 7990-7997)) a uvolněné fenylthiohydantoinylaminokyseliny byly analyzovány on-line za použití mikrootvorové C₁₈ HPLC s reverzní fází. Oba pruhy nedávají signály pro 20 až 28 sekvenční cykly, což potvrzuje, že jsou oba nesequenovatelné metodou, využívající Edman chemie. Základní hladina každého sekvenování byla mezi 1-7 pmol, a je daleko nižší než množství proteinu přítomné v pruhu. Tyto údaje potvrzují, že protein v pruzích byl ~~N~~-koncově blokován.

C. In situ CNBr štěpení elektroforeticky transferovaného proteinu a sekvenování

Pro potvrzení, že protein byl skutečně blokován, byla ze sekvenátoru odstraněna membrána (část B) a bylo provedeno štěpení bromkyanem in situ (CNBr 5 % hmotn./obj.) v 70% kyselině mravenčí 1 h při 45 °C) s následujícím sušením a sekvenční analýzou. Byly detekovány silné sekvenční signály, představující vnitřní peptidy získané ze štěpení methionylpeptidové vazby pomocí CNBr.

Oba pruhy poskytují identické směsné sekvenční signály uvedené dále v prvních pěti cyklech.

Identifikované aminokyseliny

Cyklus 1: Asp, Glu, Val, Ile, Leu

Cyklus 2: Asp, Thr, Glu, Ala, Pro, Val

Cyklus 3: Asn, Ser, His, Pro, Leu

Cyklus 4: Asp, Asn, Ala, Pro, Leu

Cyklus 5: Ser, Tyr, Pro

Oba pruhy také poskytují podobné signály až do 20 cyklů.

Počáteční výtěžky byly 40–115 pmol pro M_r 26000 pruh a 40 až 150 pmol pro M_r 29000–33000 pruh. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s původním molárním množstvím proteinu vloženým do sekvenátoru. Výsledky potvrzují, že proteinové pruhy, odpovídající SCF, obsahují blokováný N-konec. Postupy použité pro získání potřebných sekvenčních informací pro N-koncové blokované proteiny zahrnují: a) odblokování N-konce (viz sekce D), a b) získání peptidů vnitřním štěpením pomocí CNBr (viz sekce E), trypsinem (viz sekce F) a *Staphylococcus aureus* (kmen V-8) proteázou (Glu-C) (viz sekce G). Sekvenční analýza může být provedena po odstranění blokované N-koncové aminokyseliny nebo po izolaci peptidových fragmentů. Příklady jsou podrobně popsány dále.

D. Sekvenční analýza faktoru BRL kmenových buněk po zpracování s pyroglutamovou kyselinou-aminopeptidázou

Předpovědět chemický charakter blokující skupiny přítomné na amino zakončení SCF bylo obtížné. Blokování může být post-translační in vivo (F.Wold, Ann.Rev.Biochem., 50, 783–814 (1981)) nebo může vznikat in vitro během čištění. Obvykle jsou nejčastěji pozorovány dvě post-translační modifikace. Může probíhat acetylace určitých N-koncových aminokyselin jako je Ala, Ser, atd., katalyzovaná N- α -acetyltransferázou. Toto může být potvrzeno izolací a analýzou hmotovou spektrometrií N-koncově blokováného peptidu. Jestliže je aminozakončením peptidu glutamin, může probíhat deaminace jeho gama-amidu. Může pak probíhat cyklizace, zahrnující gama-karboxylát a volný N-konec za vzniku pyroglutamátu. Pro detekci pyroglutamátu může být použit enzym pyroglutamát aminopeptidáza. Tento enzym odstraňuje pyroglutamátový zbytek, štěpící volný aminokonec u druhé aminokyseliny. Pro

sekvenování může být užito Edmanovy chemie.

SCF (čištěný jako v příkladu 1, 400 pmol) v 50 mM sodném fosfátovém pufru (pH 7,6, obsahující dithiothreitol a EDTA) byl inkubován s 1,5 jednotkami pyroglutamová kyselina-aminopeptidázy telecích jater (pE-AP) po 16 h při 37 °C. Po reakci byla směs přímo vložena do proteinového sekvenátoru. Hlavní sekvence byla identifikována po 46 cyklech. Počáteční výtěžek byl asi 40 % a opakovaný výtěžek byl 94,2 %. N-terminální sekvence SCF zahrnující N-koncovou pyroglutamovou kyselinu je:

PE-AP místo štěpení

10

pyroGlu-Glu-Ile-Cys-Arg-Aso-Pro-Val-Thr-Asp-ASn-Val-Lys-Asp-

20

— Ile-Thr-Lys-Leu-Val-Ala-Asn-Leu-pro-Asn-Asp-Tyr-Met-Ile-Thr-

30

40

— Leu-Asn-Tyr-Ala-Gly-Met-Asp-Val-Leu-Pro-Ser-His-xxx-Trp-

— Leu-Arg-Asp-.....

xxx, v poloze 43 nestanoveno

Tyto výsledky prokazují, že SCF obsahuje na svém N-konci pyroglutamovou kyselinu.

E. Izolace a sekvenční analýza CNBr peptidů

SCF čištěný jako v příkladu 1 (20–28 µg), (1,0–1,5 nmol) byl zpracován s N-glykanázou jak je popsáno v příkladu 1. V tomto případě byla přeměna na materiál M_r 26000 kompletní. Vzorek byl sušen a štěpen CNBr a 70% kyselině mravenčí (5%) po 18 h při teplotě místnosti. Po štěpení byl materiál zředěn

vodou, sušen a znovu rozpuštěn v 0,1% trifluoroctové kyselině. CNBr peptidy byly odděleny HPLC s reverzní fází za použití C₄ úzké kolony za elučních podmínek stejných jak jsou popsány v sekci A tohoto příkladu. Některé hlavní peptidové frakce byly izolovány a sekvenovány a výsledky jsou sumarizovány následovně:

Peptid	retenční čas (min)	sekvence ⁴
CB-4	15,5	L-P-P---
CB-6 ¹	22,1	a. I-T-L-N-Y-V-A-G-(M) b. V-A-S-D-T-S-D-C-V-L-S-()-()-L-G- -P-E-K-D-S-R-V-S-V-()-K----
CB-B	28,0	D-V-L-P-S-H-C-W-L-R-D-(M)
CB-10	30,1	(obsahující sekvenci CB-B)
CB-15 ²	43,0	E-E-E-A-P-K-N-V-K-E-S-L-K-K-P-T- -R-(E)-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-D ³ -R-S- -I-D-A-----
CB-14	37,3	
a		
CB-16		oba peptidy obsahují sekvenci CB-15

1. Nebyly deteg^kovány aminokyseliny v polohách 12, 13 a 25. Peptid b nebyl sekvenován na konci.
2. (N) v CB-15 nebyl deteg^kován, byl odhadnut jako potenciální místo N-glykosylace. Peptid nebyl na konci sekvenován.
3. Označené místo, kde Asn může být převeden na Asp N-glykanázovým odstraněním N-připojeného cukru.
4. Byl použit následující písmenový kod: A Ala, C Cys, D Asp,

E Glu, F Phe, G Gly, H His, I Ile, K Lys, L Leu, M Met,
N Asn, P Pro, Q Gln, R Arg, S Ser, T Thr, V Val, W Trp
a Y Tyr.

F. Izolace a sekvenování faktoru BRL kmenových buněk jako tryptických fragmentů

SCF čištěný jako v příkladu 1 (20 µg ve 150 µl 0,1M hydrogenuhličitanu amonného) byl štěpen 1 µg trypsinu při 37 °C po 3,5 h. Materiál byl ihned převeden do úzké C₄ HPLC za použití elučních podmínek jak jsou popsány v sekci A tohoto příkladu. Všechny eluované peptidové píky měly retenční časy odlišné od neštěpeného SCF (Sekce A). Sekvenční analýza izolovaných peptidů je uvedena dále:

Peptid	retenční čas (min)	sekvence ⁴
T-1	7,1	E-S-L-K-K-P-E-T-R
T-2 ¹	28,1	V-S-V-()-K
T-3	32,4	I-V-D-D-L-V-A-A-M-E-E-N-A-P-K
T-4 ²	40,0	N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-()-R
T-5 ³	46,4	a. L-V-A-N-L-P-N-D-Y-M-I-T-L-N-Y-V-A-G- - M-D-V-L-P-S-H-C-W-I-R b. S-I-D-A-F--D-F-M-V-A-S-D-T-S-D-C-V- - L-S-()-()-L-G----
T-7 ⁴	72,8	E-S-L-K-K-P-E-T-R-(N)-F-T-P-E-E-F-F- - S-I-F-()-R
T-8	73,6	E-S-L-K-K-P-E-T-R-N-F-T-P-E-E-F-F-S-I- - F-D-R

1. Aminokyselina v poloze 4 nebyla označena

2. Aminokyselina v poloze 12 nebyl určena.
 3. Aminokyseliny v polohách 20 a 21 v 6 peptidu T-5 nebyly identifikovány, byly odhadem určeny jako místa O-připojení cukru.
 4. Aminokyselina v poloze 10 nebyla detegována, byla považována za Asn vzhledem k potenciálnímu N-vázanému glykosylačnímu místu. Aminokyselina v poloze 21 nebyla detegována.
- G. Izolace a sekvenování peptidů faktoru BRL kmenových buněk po štěpení S.aureus Glu- C proteázou

SCF čištěný jako v příkladu 1 (20 µg ve 150 µl 0,1M hydrogenuhličitanu amonného) bylo podrobeno štěpení Glu-C proteázou při poměru proteáza-substrát 1:20. Štěpení bylo prováděno při 37 °C po 18 hodin. Materiál byl ihned oddělen C₄ HPLC s úzkou kolonou s reverzní fází. Bylo odděleno pět hlavních peptidových frakcí a tyto byly sekvenovány:

Peptid	retenční čas (min)	sekvence ⁴
S-1	5,1	N-A-P-K-N-V-K-E
S-2 ¹	27,7	S-R-V-S-V-()-K-P-F-M-L-P-P-V-A-(A)
S-3 ²	4,3	nedetegována žádná sekvence
S-5 ³	71,0	S-L-K-K-P-E-T-R-N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F- - (N)-R-S-I-D-A-F-K-D-F-M-V-A-S-D
S-6 ³	72,6	S-L-K-K-P-E-T-R-N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F- - (N)-R-S-I-D-A-F-K-D-F-M-V-A-S-D-T-S-D

1. Aminokyselina v poloze 6 S-2 peptidu nebyla určena, mohlo by to být místo připojení O-vázaného cukru. Ala v poloze

- 16 S-2 peptidu byl dete^kgován v nízkém výtěžku.
2. Peptid S-3 může být N-konc^ově blokován peptid odvozený od N-konce SCF.
 3. N v závorkách označuje potenciální místo připojení N-vázaného cukru.

H. Sekvenční analýza faktoru BRL kmenových buněk po štěpení BNPS-skatolem

SCF2 (2 µg) v 10 mM hydrogenuhličitanu amonném byl zcela vysušen vakuovým odstředováním a pak znovu rozpuštěn ve 100 µl ledové kyseliny octové. 10ti až 20ti násobný přebytek BNPS-skatolu byl přidán k roztoku a směs byla inkubována při 50 °C po 60 min. Reakční směs pak byla sušena vakuovým odstředováním. Sušený zbytek byl extrahován 100 µl vody. Spojené extrakty pak byly podrobeny sekvenční analýze popsané výše. Byla dete^kgována následující sekven^ece:

1	10
Leu-Arg-Asp-Met-Val-Thr-His-Leu-Ser-Val-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-	
20	20
- Asp-Lys-Phe-Ser-Asn-Ile-Ser-Glu-Gly-Leu-Ser-(Asn)-Tyr-Ser-Ile-Ile-	
40	
- Asp-Lys-Leu-Gly-Ile-Val-Asp----	

Poloha 28 nebyla pozitivně určena, byla určena jako Asn jako potenciální místo N-navázané glykosylace.

Podíl SCF proteinu (500 pmol) byl pufrem převeden do 10 mM octanu sodného, pH 4,0 (celkový objem 90 µl) a byl přidán Brij-35 v koncentraci 0,05% (hmotn./obj.). 5 µl podíl byl odebrán pro kvantifikaci proteinu. 40 µl vzorku bylo zředěno na 100 µl výše popsaným pufrem. Byla přidána karboxypeptidáza

P (z *Penicillium janthinellum*) při poměru enzym-substrát 1:200. Štěpení bylo prováděno při 25 °C a byly odebírány 20 µl podíly za 0, 15, 30, 60 a 120 min. Štěpení bylo ukončeno v každé době přidáním trifluoroctové kyseliny v celkové koncentraci 5 %. Vzorby byly sušeny a uvolněné aminokyseliny byly derivatizovány reakcí s Dabsylchloridem (dimethylaminobenzensulfonylchlorid) v 0,2M NaHCO₃ (pH 9,0) při 70 °C po 12 min (Chang a spol., *Methods Enzymol.*, 90, 41-48 (1983)). Derivatizované aminokyseliny (jedna šestina každého vzorku) byly analyzovány HPLC s úzkou kolonou s reverzní fází s modifikací postupu podle Changa a spol. (*Techniques in Protein Chemistry*, T. Hugli vyd., Acad. Press, NY (1989), str. 305-311). Kvantitativní složení, odpovídající určité době bylo získáno porovnáním standardů derivatizovaných aminokyselin (1 pmol). V době 0 byl detegován kontaminující glycin. Alanin byl jedinou aminokyselinou, která stoupala s inkubačním časem. Po 2 hodinách inkubace byl Ala detegován v celkovém množství 25 pmol, ekvivalentní 0,66 mol Ala uvolněného na mol proteinu. Výsledek indikuje, že přírodní savčí SCF molekuly obsahují Ala na svém karboxylovém konci, což je v souladu se sekvenční analýzou O-koncového peptidu, S-2, který obsahuje C-koncový Ala. Tento závěr je také v souladu se známou specifikou karboxypeptidázy P (Lu a spol., *J. Chromatog.* 447, 351-364 (1988)). Například štěpení probíhá, jestliže je předpovězena sekvence Pro-Val. Peptid S-2 měl sekvenci S-R-V-S-V-()-K-P-F-M-L-P-P-V-A-(A) a bylo předpokládáno, že je C-koncovým peptidem SCF (viz též sekce J tohoto příkladu). C-koncová sekvence ---P-V-A(A) omezuje proteázové štěpení pouze na alanin. Aminokyselinové složení peptidu S-2 indikuje přítomnost 1 Thr, 2 Ser, 3 Pro, 2 Ala, 3 Val, 1 Met, 1 Leu, 1 Phe, 1 Lys a 1 Arg, celkem 16 zbytků. Detekce 2 Ala zbytků indikuje, že zde mohou být dva Ala zbytky

na C-konci tohoto peptidu (viz tabulka v sekci G). BRL SCF je tak zakončen Ala 164 nebo Ala 165.

J. Sekvence SCF

Kombinací výsledků získaných ze sekvenční analýzy (1) intaktního faktoru kmenových buněk po odstranění jeho N-terminální pyroglutamové kyseliny, 2) CNBr peptidů, 3) trypsin peptidů a 4) Glu-C peptidázových fragmentů, N-koncové sekvence a C-koncové sekvence byly dedukovány (obr. 11). N-koncová sekvence začíná u pyroglutamové kyseliny a končí u Met-48. C-koncová sekvence obsahuje 84/85 aminokyselin (poloha 82 až 164/165). Sekvence od polohy 49 do 81 nebyla detegována v žádném z izolovaných peptidů. Nicméně sekvence byla detegována u velkého peptidu po BNPS-skatolovém štěpení BRL SCF jak je popsáno v sekci H tohoto příkladu. Z těchto dalších údajů jakož i DNA sekvencí získaných z krysího SCF (příklad 3) mohou být N- a C-koncové sekvence určeny a celková sekvence sestavena jak je uvedeno na obr. 11. N-konec molekuly je pyroglutamová kyselina a C-konec je alanin jak je potvrzeno štěpením pyroglutamát aminopeptidázou a karboxypeptidázou P.

Ze sekvenčních údajů je zřejmé, že Asn-72 je glykosylován, Asn-109 a Asn-120 jsou pravděpodobně glykosylovány v některých molekulách, ale v jiných ne. Asn-65 by mohl být během sekvenční analýzy detegován, a proto může být jen částečně glykosylován, pokud vůbec je. Ser-142, Thr-143 a Thr-155 předpovězené z DNA sekvence, nebyly detegovány během aminokyselinové sekvenční analýzy, a proto by mohly být místy O-vázaného karbohydrátového připojení. Tato potenciální místa karbohydrátového připojení jsou uvedena na obr. 11; N-vázaný karbohydrát je indikován polotučnými písmeny v závorkách,

O-vázaný karbohydrát volnými polotučnými písmeny.

K. Analýza složení aminokyselin faktoru BRL kmenových buněk

Materiál z C₄ kolony na obr. 7 byl připraven pro analýzu složení aminokyselin zahuštěním a puřrovou výměnou do 50 mM hydrogenuhličitánu sodného.

Dva 70 µl vzorky byly odděleně hydrolyzovány v 6N HCl, obsahující 0,1 % fenolu a 0,05 % 2-merkaptóethanolu při 11 °C za vakua po 24 hodin. Hydrolyzáty byly sušeny, rekonstituovány v puřru na bázi citrátu sodného a analyzovány za použití iontovýměnné chromatografie (Beckman Model 6300 analyzátor aminokyselin). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Použití 164 aminokyselin (ze sekvenčních proteinových dat) pro výpočet složení aminokyselin poskytuje lepší předpověď hodnot než použití 193 aminokyselin (jak je dedukováno z PCR odvozených DNA sekvenčních hodnot, obr. 14C).

Tabulka 3

Kvantitativní složení aminokyselin v savčím SCF

Aminoky- seliny	složení aminokyselin mol na mol proteinu ¹		předpovídané zbytky na molekulu ²	
	pok.č.1	pok.č.2	(A)	(B)
Asx	24,46	24,26	25	28
Thr	10,37	10,43	11	12
Ser	14,52	14,30	16	24
Glx	11,44	11,37	10	10
Pro	10,90	10,85	9	10
Gly	5,81	6,20	4	5
Ala	8,62	8,35	7/8	8
cys	nd	nd	4	5
Val	14,03	13,96	15	15
Met	4,05	3,99	6	7
Ile	8,31	8,33	9	10
Leu	17,02	16,97	16	19
Tyr	2,86	2,84	3	7
Phe	7,96	7,92	8	8
His	2,11	2,11	2	3
Lys	10,35	11,28	12	14
Trp	nd	nd	1	1
Arg	4,93	4,99	5	6
celkem	158	158	164/165	193

vypočtená molekulová hmotnost

18,424³

1. Vztaženo na 158 zbytků z proteinové sekvenční analýzy (s výjimkou Cys a Trp).
2. Teoretické hodnoty vypočtené z údajů proteinové sekvence (A) nebo z údajů DNA sekvence (B).
3. Vztaženo na 1-164 sekvence.

Zahrnutí známého množství vnitřního standardu do analýzy aminokyselinového složení také umožňuje kvantifikaci proteinu ve vzorku, pro analyzovaný vzorek byla získána hodnota 0,117 mg/ml.

Příklad 3

Klonování genů pro kryší a lidský SCF

A. Amplifikace a sekvenování kryších SCF cDNA fragmentů

Determinace aminokyselinové sekvence fragmentů kryšího SCF proteinu umožnila označit smíšenou sekvenci oligonukleotidů, specifickou pro kryší SCF. Oligonukleotidy byly využity jako hybridizační sondy ke zjištění kryší cDNA a genomových knihoven a jako primery v pokusech amplifikovat části cDNA použitím polymerázové řetězové reakční (PCR) strategie (Mullis a spol., *Methods in Enzymol.* 155, 335-350 (1987)). Oligonukleotidy byly syntetizovány fosforamiditovou metodou (Beaucage a spol., *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981), McBride a spol., *Tetrahedron Lett.*, 24, 245-248 (1983)), jejich sekvence jsou zobrazeny na obr. 12A. Písmena znamenají A adenin, T thymin, C cytosin, G guanin, I inosin, obr. 12A představuje oligonukleotidy, které obsahují sekvence zjistitelné restrikcí endonukleázami. Sekvence jsou zapsány 5' → 3'.

Krysí genomová knihovna, krysí jaterní genomová knihovna a dvě BRL cDNA knihovny byly zjištěny použitím ^{32}P -značených oligonukleotidových sond, 219-21 a 219-22 (obr. 21A), jejichž sekvence byly vztaženy na aminokyselinové sekvence získané v příkladu 2. Žádné SCF klony nebyly v tomto experimentu získány použitím standardních metod cDNA klonování (Maniatis a spol., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor 212-246 (1982)).

V alternativním pokusu jehož výsledkem byla izolace sekvence nukleové kyseliny pro SCF, se použila PCR technika. V těchto metodách je oblast DNA vymezená dvěma primery amplifikovaná in vitro multiplikovanými cykly replikace katalyzovanými vhodnou DNA polymerázou (jako je TaqI DNA polymeráza) za přítomnosti deoxynukleosidtrifosfátů v zařízení pro tepelné cykly. Specifita PCR amplifikace spočívá na dvou oligonukleotidových primerech, které ohraničují DNA segment, který má být amplifikován a hybridizován k protilehlému řetězci. PCR s dvoustrannou specifitou pro jednotlivé DNA oblasti v komplexu směsi je dosaženo užitím dvou primerů se sekvencí dostatečně specifickou pro tento region. PCR s jednostrannou specifitou využívá primer specifický pro jednu oblast a druhý primer, který může začínat v cílových místech přítomných na mnoha nebo všech DNA molekulách ve směsi (Loh a spol., Science, 243, 217-220 (1989)).

DNA produkty úspěšné PCR amplifikační reakce jsou zdrojem informace o DNA sekvenci (Gyllesten, Biotechniques, 7, 700-708 (1989)) a mohou být využity k výrobě značených hybridních sond, majících větší délku a vyšší specifitu než oligonukleotidové sondy. PCR produkty mohou také být značeny, se vhodnou primerovou sekvencí, ke klonování do plasmidových vektorů, které dovolují expresi kodovaného peptidového

produktu.

Základní strategie pro získání DNA sekvence kryší SCF cDNA je načrtnuta na obr. 13A. Malé šipky indikují DNA sekvenční reakce. PCR 90,6 a 96,2, ve spojení s DNA sekvenováním, byly použity k získání částečně nukleokyselinové sekvence pro kryší SCF cDNA. Primery použité v těchto PCR byly smíšené oligonukleotidy vztažené na aminokyselinové sekvence uvedené na obr. 11. Použitím sekvenční informace získané z PCR 96,6 a 96,2, unikátní sekvenční primery (224-27 a 224-28, obr. 12A) byly vyrobeny a použity v následující amplifikaci a sekvenčních reakcích. DNA obsahující 5' konec cDNA byla získána v PCR 90,3, 96,6 a 625,1 použitím jednostranně specifické PCR. Další DNA sekvence blízko C-konce SCF proteinu byla získána v PCR 90,4. DNA sekvence pro zbytek kodujícího regionu kryší SCF cDNA byla získána z PCR produktů 630,1, 630,2, 84,1 a 84,2, jak je popsáno dále v sekci C tohoto příkladu. Techniky použité pro získání kryší SCF cDNA jsou popsány dále.

RNA byla připravena z BRL buněk jak popisuje Okayama a spol. (Methods Enzymol., 154, 3-28 (1987)). PolyA⁺ RNA byla izolována za použití oligo(dT)celulózové kolony jak popisuje Jacobson (v Methods in Enzymology, sv. 152, 254-261 (1987)).

První řetězec cDNA byl syntetizován použitím 1 µg BRL poly⁺ RNA jako templátu a (dT)₁₂₋₁₈ jako primeru v souladu s doplněným enzymem, Mo-MLV reverzní transkriptázou (Bethesda Research Laboratories). Degradace řetězce RNA byla provedena použitím 0,14M NaOH při 84 °C za 10 minut nebo inkubací ve vroucí vodní lázni 5 minut. Přbytek octanu amonného byl přidán pro neutralizaci roztoku a cDNA byla nejprve

extrahována fenol/chloroformem, pak extrahována chloroformem/isoamylalkoholem a pak vysrážena ethanolem. Pro umožnění oligo(dC)-primerů v PCR s jednostrannou specifitou, byl poly(dG) konec přidán na 3' konec části prvního řetězce cDNA terminální transferázou z telecího thymu (Boehringer Mannheim) jak bylo popsáno dříve (Deng a spol., *Methods Enzymol.*, 100, 96-103 (1983)).

Pokud není v dalších popisech, které následují, jinak, je denaturační krok v každém PCR cyklu prováděn při 94 °C 1 minutu a elongace byla při 72 °C 3 nebo 4 minuty. Teplota a trvání chlazení byla různá podle PCR, často představují kompromis vztažený na odhad potřeby několika rozdílných PCR provedených současně. Jestliže primerové koncentrace byly sníženy pro snížení akumulace primerových artefaktů (Watson, *Amplifications*, 2, 56 (1989)), je indikována delší doba anelace, když byla koncentrace PCR produktu vysoká, byla použita kratší doba a vyšší koncentrace primerů pro zvýšení výtěžku. Významným faktorem v určení teploty anelace byl odhad T_d primer-cílové místo asociace (Suggs a spol., v *Developmental Biology Using Purified Genes*, vyd. Brown D. D. a Fox C.F. (Academic, New York), str. 683-693 (1981)). Enzymy použité v amplifikaci byly získány od jednoho ze tří výrobců: Stratagene, Promega nebo Perkin-Elmer Cetus. Reaktanty byly použity podle doporučení výrobce. Amplifikace byla provedena v zařízení pro DNA tepelné cykly Coy Tempcycle nebo Perkin-Elmer Cetus.

Amplifikace SCF cDNA fragmentů byla obvykle zkoušena elektroforézou na agarózovém gelu za přítomnosti ethidiumbromidu a vizualizace fluorescencí DNA pruhů stimulované ultrafialovým zářením. V některých případech, kde

byly malé fragmenty anticipovány, byly PCR produkty analyzovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Ověření toho, že pozorované proužky reprezentují SCF cDNA fragmenty bylo získáno pozorováním příslušných DNA proužků následujících amplifikací s jedním nebo více vnitřně usazenými primery. Konečné ověření bylo uskutečněno dideoxysekvenováním (Sanger a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 5463-5467 (1977) PCR produktů a srovnání předpokládaných translačních produktů se sekvenční informací SCF peptidu.

V počátečních PCR experimentech byly použity smíšené oligonukleotidy založené na SCF proteinové sekvenci (Gould, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 1934-1938 (1989)). Dále jsou popsány PCR amplifikace, které byly použity k získání DNA sekvenční informace pro krysí cDNA kodující aminokyseliny -25 až 162.

V PCR 90,6, byla BRL cDNA amplifikována se 4 pmol 222-11 a 223-6 v reakčním objemu 20 μ l. Části produktu PCR 90,6 byly elektroforézovány na agarózovém gelu a byly pozorovány proužky přibližně očekávané velikosti. Jeden μ l PCR 90,6 produktu byl amplifikován dále se 20 pmol primerů 222-11 a 223-6 v 15 cyklech, anelován při 45 °C. Část tohoto produktu byla pak podrobena 25 cyklům amplifikace za přítomnosti primerů 222-11 a 219-25 (PCR 96,2), poskytla pak pruh jednoho hlavního produktu při elektroforéze na agarozovém gelu. Asymetrická amplifikace produktu PCR 96,2 se stejnými dvěma primery produkovala templáty, které byly pak úspěšně sekvenovány. Další selektivní amplifikace SCF sekvencí v produktu 96,2 byla provedena PCR amplifikací produktu za přítomnosti 222-11 a usazeného primeru 219-21. Produkt této PCR byl použit jako templát pro asymetrickou amplifikaci a výrobu radioaktivně

značených sond (PCR2).

Kluzování 5' konce cDNA kryšího SCF_x byly primery, obsahující (dC)_n sekvenční, komplementární k poly(dG) koncům cDNA, využity jako nespecifické primery. SCF 90,3 obsahuje (dC)₁₂ (10 pmol) a 223-6 (4 pmol) jako primery a BRL cDNA jako templát. Reakční produkty vytvářejí agregáty vysoké molekulové hmotnosti, zůstávající v jamkách při elektroforéze na agarozovém gelu. Jeden μ l produkovaného roztoku byl dále amplifikován za přítomnosti 25 pmol (dC)₁₂ a 10 pmol 223-6 v objemu 25 μ l v 15 cyklech, anelován při 45 °C. Půl μ l tohoto produktu bylo pak amplifikováno po 25 cyklů s vnitřně usazeným primerem 219-25 a 201-7 (PCR 96,6). Sekvence 201-7 je znázorněna na obr. 12C. Při elektroforéze na agarozovém gelu nebyly pozorovány žádné pruhy. Bylo provedeno 25 dalších cyklů PCR při 40 °C, po kterých byl pozorován jeden prominentní pruh. Byl proveden ^{blotting} "vypijakování" podle Southerna a byl pak pozorován jeden výrazný hybridizovaný pruh. Další 25 cyklů PCR (625,1), při 45 °C, bylo provedeno za použití 201-7 a usazeného primeru 224-27. Sekvenování bylo provedeno po asymetrické amplifikaci prostřednictvím PCR, získaly se sekvenční, které obsahovaly po domnělém aminokonci předpokládanou signální peptid kodující sekvenci pre-SCF. Tato sekvenční je využita k označení oligonukleotidového primeru 227-29, obsahujícího 5' konec kodujícího regionu cDNA kryšího SCF. Obdobně 3' DNA sekvenční, končící na aminokyselině 162 byla získána sekvenováním PCR 90,4 (viz obr. 13.A).

B. Klonování genomové DNA kryšího buněčného kmenového faktoru

Sondy získané z PCR amplifikace cDNA, kodující kryší SCF jak je popsáno výše v části A, byly použity k prohledání

knihovny, obsahující kryší genomové sekvence (získané od CLONTECH Laboratories, Inc., katalogové číslo RL1022 j). Knihovna byla konstruována v bakteriofágovém lambda vektoru EMBL-3 SP6/T7 užitím DNA získané z dospělého samce krysy Sprague-Dawley. Knihovna, jak je charakterizována dodavatelem, obsahuje $2,3 \times 10^6$ nezávislých klonů s průměrnou inzertní velikostí 16 kb.

PCR byla použita ke generování ^{32}P -značených sond použitých ve screeningu genomové knihovny. Sonda PCR 1 (obr.13A) byly připraveny v reakci, která obsahuje $16,7 \mu\text{M}$ ^{32}P (alfa)-dATP, $200 \mu\text{M}$ dCTP, $200 \mu\text{M}$ dGTP, $200 \mu\text{M}$ dTTP, reakční pufr doporučený Perkin Elmer Cetus, Taq polymerazu (Perkin Elmer Cetus) při 0,05 jednotek/ml, $0,5 \mu\text{M}$ 219-26, $0,05 \mu\text{M}$ 223-6 a $1 \mu\text{l}$ templátu 90,1, obsahujícím cílová místa pro dva primery. Sonda PCR 2 byla vytvořena použitím stejných reakčních podmínek, pouze primery a templát byly změněny. Sonda PCR 2 byla vyrobena použitím $0,5 \mu\text{M}$ 222-11, $0,5 \mu\text{M}$ 219-21 a $1 \mu\text{l}$ templátu odvozeného z PCR 96,2.

Přibližně 10^6 bakteriofágů bylo umístěno na plotnu jak popisuje Maniatis a spol. (supra (1982)). Plaky byly transferovány na GeneScreen Plus™ filtry (22 cm x 22 cm, NEN/DuPont), které byly denaturovány, neutralizovány a sušeny, jak je popsáno v protokolu od výrobce. Z každé plotny byly provedeny dva přenosy na filtr.

Filtry byly prehybridizovány v 1M NaCl, 1% SDS, 0,1% albuminu hovězího séra, 0,1% ficollu, 0,1% polyvinylpyrrolidonu (hybridizační roztok) po dobu přibližně 16 h při 65°C a skladovány při -20°C . Filtry byly transferovány do čerstvého hybridizačního roztoku, obsahujícího ^{32}P -značenou PCR sondu v

$1,2 \times 10^5$ cpm/ml a hybridizovány 14 h při 65 °C. Filtry byly vymyty v 0,9M NaCl, 0,09M citrátu sodném, 0,1% SDS, pH 7,2 (promývací roztok) 2 hodiny při teplotě místnosti s následujícím druhým promytím čerstvým promývacím roztokem 30 minut při 65 °C. Bakteriofágové klony z oblastí ploten, odpovídající radioaktivním bodům, byly přemístěny z ploten a znovu prohledány sondami PCR 1 a PCR 2.

DNA z pozitivních klonů byla štěpena restričními endonukleázami MabHI, SphI nebo SstI a výsledné fragmenty byly subklonovány do pUC119 a následně sekvenovány. Strategie pro sekvenování kryší genomové SCF DNA je schematicky znázorněna na obr. 14A. Na tomto obrázku křivka nakreslená nahoře představuje oblast kryší genomové DNA kodující SCF. Mezery ve křivce indikují oblasti, které nejsou sekvenovány. Velké rámečky představují exony kodujícího regionu SCF genu s odpovídající aminokyselinou uvedenou nad každým rámečkem. Šipky představují individuální oblasti, které byly sekvenovány a použity k sestavení souhlasné sekvence pro kryší SCF gen. Sekvence pro kryší SCF gen je uvedena na obr. 14B.

Použitím PCR 1 sondy ke screeningu kryší genomové knihovny byly izolovány klony, odpovídající exonům, kodujícím aminokyselinou 19 - 176 SCF. Aby se získaly klony pro další exony kodujícího regionu pro aminokyselinu 19, byla knihovna screenována použitím oligonukleotidových sond 228 - 30. Stejná sada filtrů, jaká byla použita dříve se sondou PCR 1, byla prehybridizována jako předtím a hybridizována v hybridizačním roztoku, obsahujícím ^{32}P -značený oligonukleotid 228-30 (0,03 picomol/l) při 80 °C po 16 hodin. Filtry byly promyty v promývacím roztoku při teplotě místnosti po dobu 30 min a následovně znovu promyty v čerstvém promývacím roztoku při 45

°C po dobu 15 minut. Bakteriofágové klony z oblastí ploten, odpovídající radioaktivním bodům na autoradiogramech, byly přemístěny z ploten a znovu screenovány sondou 228 až 30. DNA z pozitivních klonů byla štěpena restričními endonukleázami a subklonována jak bylo popsáno. Použitím sondy 228-30 byly získány klony, odpovídající exonům, kodujícím aminokyseliny -20 až 18.

Bylo provedeno několik pokusů izolovat klony, odpovídající exonu(ům), obsahujícímu 5'-netranslatovaný region pro aminokyseliny -25 až -21. Nebyly izolovány žádné klony pro tento region krysího SCF genu.

C. Klonování krysí cDNA pro expresi v savčích buňkách

Savčí buněčné expresní systémy byly vymyšleny pro zjištění toho, jsou-li aktivní polypeptidové produkty krysího SCF schopny být exprimovány a secernovány savčími buňkami. Expresní systémy byly vymyšleny pro expresi zkrácených verzí krysího SCF (SCF¹⁻¹⁶² a SCF¹⁻¹⁶⁴) a proteinu (SCF¹⁻¹⁹³) předpovězených z translace genové sekvence na obr. 14C.

Expresní vektor užitý v těchto studiích byl "shuttle" vektor, obsahující pUC119, SV40 a HTLVI sekvence. Vektor byl označen pro umožnění autonomní replikace jak v *E.coli* tak v savčích buňkách a k expresi vložené exogenní DNA pod kontrolou virových DNA sekvencí. Tento vektor, označený V19.8 v *E.coli* DH5 je uložen v American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. (ATCC č. 68124). Tento vektor je derivátem pSVDM19 popsaného v Souzově US patentu č. 4810643, kter je zde uveden jako odkaz.

cDNA pro krysí SCF 1-162 byla vložena do plasmidového vektoru V19.8. cDNA sekvence je uvedena na obr. 14C. cDNA, která byla použita v této konstrukci byla syntetizována v PCR reakcích 630-1 a 630-2, jak ukazuje obr.13A. Tyto PCR představují nezávislé amplifikace a využívají syntetických oligonukleotidových primerů 227-29 a 227-30. Sekvence pro tyto primery byly získány z PCR generované cDNA, jak je popsáno v sekci A tohoto příkladu. Reakční směs, 50 μ l objem, obsahuje 1x reakční pufr (z Perkin Elmer Cetus kitu), 250 μ M dATP, 250 μ M dCTP, 250 μ M dGTP a 250 μ M dTTP, 200 ng oligo(dT)-primované cDNA, 1 picomol 227-29, 1 picomol 227-30 a 2,5 jednotky Taq polymerázy (Perkin Elmer Cetus). cDNA byla amplifikována za použití denaturační teploty 94 °C po 1 minutu a 2 minutovém chlazení na teplotu 37 °C a elongační teploty 72 °C po 1 minutu. Po těchto prvních kolech PCR amplifikace bylo přidáno 10 pikomol 227-29 a 10 picomol 227-30. Amplifikace pokračovaly 30 cykly za stejných podmínek s výjimkou toho, že teplota chlazení byla změněna na 55 °C. Produkty PCR byly štěpeny restrikcí endonukleázami HindIII a SstII. V19.8 byl shodně HindIII a SstII a v jednom případě byl štěpený plasmidový vektor podroben působení telecí intestinální alkalické fosfatázy, v jiném případě byl dlouhý fragment ze štěpení izolován z agarového gelu. cDNA byla ligována do V19.8 použitím T4 polynukleotidové ligázy. Produkty ligace byly transformovány do kompetentního E.coli kmenu DH5 jak bylo popsáno (Okayama a spol., suopra (1987)). DNA připravená z jednotlivých bakteriálních klonů byla sekvenována Sangerovou dideoxymetodou. Obr. 17 představuje konstrukci V19.8 SCF. Tyto plasmidy byly využity k transfekci savčích buněk, jak je popsáno v příkladu 4 a příkladu 5.

Expresní vektor pro krysí SCF 1-164 byl konstruován

použitím strategie podobné té, která byla použita pro SCF¹⁻¹⁶², ve které cDNA byla syntetizována použitím PCR amplifikace a následně vložena do V19.8. cDNA použitá v konstrukcích byla syntetizována v PCR amplifikacích s V19.8, obsahujících SCF¹⁻¹⁶² cDNA (V19.8:SCF¹⁻¹⁶²) jako templátem, 227-29 jako primerem pro 5'-konec genu a 237-19 jako primerem pro 3'-konec genu. Další reakce (50 μ l), obsahující 1x reakční pufr 250 μ M každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 2,5 jednotek Taq polymerázy, 20 ng V19.8:SCF¹⁻¹⁶² a 20 pocomol každého primeru. cDNA byla amplifikována 35 cyklů použitím denaturační teploty 94 °C 1 minutu, teplotě chlazení 55 °C po 2 minuty a elongační teplotě 72 °C po 2 minuty. Produkty amplifikací byly štěpeny restrikcími endonukleázami hindIII a SstII a inzertovány do V19.8. Výsledný vektor obsahuje kodující oblas pro aminokyseliny -25 až 164 SCF následovanou terminačním kodonem.

cDNA pro 193 aminokyselinami tvořený krysí SCF (krysí SCF¹⁻¹⁹³ je předpovězen z translace DNA sekvence na obr. 14C) byla také vložena do plasmidového vektoru V19.8 použitím postupu shodného s postupem použitým pro krysí SCF¹⁻¹⁶². cDNA, která byla použita v této konstrukci, byla syntetizována v PCR reakcích 84.1 a 84.2 (obr. 13A) využitím oligonukleotidů 227-9 a 230-25. Dvě reakce představují nezávislé amplifikace, začínající z rostlinných RNA preparátů. Sekvence 227-29 byla získána cestou PCR reakcí jak je popsáno v sekvenci A tohoto příkladu a sekvence pro primer 230-25 byla získána z krysí genomové DNA (obr.14B). Reakční směs, 50 μ l objem, obsahovala 1x reakční pufr (z kitu Perkin Elmer Cetus), 250 μ M dATP, 250 μ M CTP, 250 μ M dATP, 250 μ M dCTP, 250 μ M d GTP a 250 μ M dTTP, 200 mg oligo(dT)-primované cDNA, 10 pikomol 227-29, 10 pikomol 230-25 a 2,5 jednotek Taq polymerázy (Perkin Elmer Cetus).

cDNA byla amplifikována v 5 cyklech za použití denaturační teploty 94 °C po 1 1/2 minuty, teplotě chlazení 50 °C po 2 min a teplotě elongace 72 °C po 2 min. Po těchto počátečních cyklech pokračovala amplifikace za stejných podmínek s tou výjimkou, že teplota chlazení byla změněna na 60 °C. Produkty PCR amplifikace byly štěpeny restrikcími endonukleázami HindIII a SstII. V19.9 DNA byla štěpena HindIII a SstII a dlouhé fragmenty ze štěpení byly izolovány z agarozového gelu. cDNA byla ligována do V19.8 použitím polynukleotidové ligázy. Produkty ligace byly transformovány do kompetitivního E.coli kmenu DH5 a DNA připravená z jednotlivých bakteriálních klonů byla sekvenována. Tyto plasmidy byly použity k transfekci savčích buněk v příkladu 4.

D. Amplifikace a sekvenování PCR produktů lidské SCF cDNA

Lidská SCF cDNA byla získána z hepatomální buněčné linie HepG2 (ATCC HB 8065) za použití PCR amplifikace jak je znázorněno na obr.13B. Základní strategie byla amplifikovat lidskou cDNA PCR s primery, jejichž sekvence byly získány z krysí SCF cDNA .

RNA byla připravena jak popisuje Maniatis a spol. (supra (1982)). PolyA+ RNA byla připravena použitím oligo dT celulozy podle návodu výrobce (Collaborative Research Inc.).

První řetězec cDNA byl připraven jak je popsáno výše pro BRL cDNA s tou výjimkou, že syntéza byla začata 2 µM oligonukleotidu 228-28, uvedeného na obr. 12C, který obsahoval krátkou nahodilou sekvenci na 3' konci připojenou k delší unikátní sekvenci. Unikátní sekvence z 228-28 poskytuje cílové místo pro amplifikaci PCR s primerem 228-29 jako nespecifickým

primerem. Lidská cDNA sekvenční příbuzná alespoň části krysí SCF sekvenční byla amplifikována z Hep62 cDNA použitím primerů 227-29 a 228-29 (PCR 22.7, viz obr.13B, 15 cyklů chlazení při 60 °C následovaných 15 cykly chlazení při 55 °C).

Elektroforéza na agarózovém gelu ukázala nezřetelné proužky, pouze skvrny patrně heterologní DNA. Další preferovaná amplifikace sekvencí, týkajících se krysí SCF cDNA byla zkoušena provedením PCR s 1 µl produktu PCR 22.7 použitím vnitřně usazeného krysího SCF primeru 222-11 a primeru 228-29 (PCR 24.3, 20 cyklů chlazení při 55 °C). Znovu byly pozorovány pouze heterogenní skvrny DNA produktů na agarózových gelech. Dvojstranná specifická amplifikace produktu PCR 24.3 s primery 222-11 a 227-30 (PCR 25.10, 10 cyklů) dalo vzniknout jednomu proužku majoritního produktu stejné velikosti jako odpovídající krysí SCF cDNA PCR produkt. Sekvenování asymetrického PCR produktu (PCR 33.1) DNA použitím 224-24 jako sekvenčního primeru, poskytlo okolo 70 bází lidských SCF sekvencí.

Podobně amplifikace 1 µl PCR 22.7 produktu, nejprve s primery 224-25 a 228-29 (PCR 24.7, 20 cyklů), pak s primery 224-25 a 227-30 (PCR 41.11) vyvolala jeden majoritní proužek té samé velikosti jako odpovídající krysí SCF produkt a po asymetrické amplifikaci (PCR 42.3) poskytla sekvenci, která byla vysoce homologní ke krysímu SCF, jestliže byl 224-24 použit jako sekvenční primer. Unikátní sekvenční oligonukleotidů cílených pro lidskou SCF cDNA byly syntetizovány a jejich sekvenční je uvedena na obr. 12B.

K získání lidského protějšku krysí SCF PCR generované kodující sekvenční, která byla použita ve studiu exprese a aktivity, byla provedena PCR s primery 227-29 a 227-30 v 1 µl

PCR 22.7 produktu v reakčním objemu 50 μ l (PCR 39.1). Amplifikace byla provedena v zařízení Coy-Tempcycler. protože stupeň odlišnosti mezi lidskou SCF cDNA a krysím SCF unikátním primerem 227-30 byl neznámý, bylo pro první tři cykly použito výraznější chlazení (37 °C), později bylo chlazeno na 50 °C. Prominentní proužek stejné velikosti (okolo 590 bp) jako krysí homolog se objevil a byl dále amplifikován zředěním malé dávky produktu PCR 39.1 a PCR se stejnými primery (PCR 41.1). Protože byl pozorován více než jeden proužek v produktech PCR 41.1, byla provedena další PCR se vnitřně usazenými primery, aby se determinovala alespoň část jeho sekvence před klonováním. Po 23 cyklech PCR s primery 231-27 a 227-29 (PCR 51.2), byl patrný samostatný intenzivní proužek. Asymetrická PCR s primery 227-29 a 231-27 a sekvenování potvrdily přítomnost lidské SCF cDNA sekvence. Klonování PCR 41.1 SCF DNA do expresního vektoru V19.8 bylo provedeno tak, jak už bylo popsáno pro krysí PCR fragmenty v sekci C. DNA z jednotlivých bakteriálních klonů byla sekvenována Sangerovou dideoxymetodou.

E. Klonování genomové DNA lidských faktorů kmenových buněk.

PCR7 sonda získaná z PCR amplifikace cDNA, viz obr.13B, byla použita ke screeningu knihovny, obsahující lidské genomové sekvence. Ribosonda komplementární k části lidské SCF cDNA, viz výše, byla použita k rescreeningu pozitivních plaků. PCR 7 sonda byla připravena s produktem PCR 41 jako výchozím materiálem (viz obr.13B). Produkt PCR 41.1 byl dále amplifikován s primery 227-29 a 227-30. Výsledný 590 bp fragment byl eluován z agaróзовého gelu a reamplifikován se stejnými primery (PCR 58.1). Produkty PCR 58.1 byly zředěny 1000x 50 μ l reakční směsí, obsahující 10 pmol 233-13 a

amplifikovány v 10 cyklech. Po přidání 10 pmol 227-30 k reakční směsi se PCR provádí ve 20 cyklech. Přidá se dalších 80 pmol 233-13 a reakční objem se zvýší na 90 μ l a PCR pokračuje v dalších 15 cyklech. Reakční produkty byly zředěny 200krát v 50 μ l reakční směsi, bylo přidáno 20 pmol 231-27 a 20 pmol 233-13 a PCR byla provedena ve 25 cyklech za použití teploty chlazení 48 °C v reakci 96.1. Pro přípravu ^{32} P-značené PCR7 byly použity stejné reakční podmínky jako byly použity pro výrobu SCF1 s následujícími rozdíly: v reakčním objemu 50 μ l PCR 96.1 byla zředěna 100krát, bylo použito 5 pmol 231-27 jako prostý primer a 45 cyklů PCR bylo provedeno s denaturací při 94 °C po 1 minutu, chlazení 48 °C po 2 minuty a elongaci při 72 °C po 2 minuty.

Ribosonda, ribosonda 1, byla ^{32} P-značená jednořetězcová RNA komplementární k nukleotidům 2-436 hSCF DNA sekvence uvedené na obr. 15B. Ke konstrukci vektoru pro produkci této sondy byl PCR 41.1 (obr.13B) produkt DNA štěpen HindIII a EcoRI a klonován do polylinkeru plasmidového vektoru pGEM3:hSCF (Promega Madison, Wisconsin). Rekombinantní pGEM3:hSCF plasmidová DNA byla pak linearizována štěpením HindIII. ^{32} P-značená ribosonda 1 byla připravena z linearizované plasmidové DNA "runoff" transkripcí s T7 RNA polymerázou v souladu s instrukcemi poskytovanými Promegou. Reakční směs (3 μ l) obsahovala 250 ng linearizované plasmidové DNA a 20 μ M ^{32} P-rCTP (katalogové č. NEG-008H, New England Nuclear (NEN)) se žádnou další neznačenou CTF.

Lidská genomová knihovna byla získána ze Stratagene (La Jolla, CA, katalog.č.:946203). Knihovna byla konstruována ve Fix II vektoru bakteriofágu Lambda použitím DNA připravené z bělošské samičí placenty. Knihovna jak je charakterizována

dodavatelem, obsahovala $2 \cdot 10^6$ primárních plaků s průměrnou velikostí inzertů větší než 15 kb. Přibližně 10^6 bakteriofágů bylo umístěno na plotnu jak uvádí Maniatis a spol. (Výše (1982)). Plaky byly transfektovány do Gene Screen PlusTM filtrů (22 cm², NEN/DuPont) podle protokolu výrobce. Pro každou plotnu byly provedeny dva transfekty na filtr.

Filtry byly prehybridizovány v 6XSSC (0,9 M NaCl, 0,09 M citrát sodný pH 7,5), 1% SDS při 60 °C. Filtry byly hybridizovány v čerstvém 6XSSC, 1% SDS roztoku, obsahujícím ³²P-značenou PCR 7 sondu při 2×10^5 cpm/ml a hybridizovány po 20 h při 62 °C. Filtry byly promyty v 6XSSC, 1 % SDS po 16 h při 62 °C. Bakteriofágové výřezy byly přemístěny z plochy plotny odpovídající radioaktivním bodům na autoradiogramech a rescreenovány sondou PCR 7 a ribosondou 1. Rescreening sondou PCR 7 byl proveden za podmínek shodných s podmínkami při počátečním screeningu. Rescreening ribosondou 1 byl proveden následovně: filtry byly prehybridizovány v 6XSSC, 1 % SDS a hybridizovány při 62 °C po 18 h v 0,25M NaPO₄, (pH 7,5), 0,25 M NaCl, 0,001 M EDTA, 15 % formamid, 7 % SDS a ribosonda při 1×10^6 cpm/ml. Filtry byly promývány v 6XSSC, 1 % SDS po 30 min při 62 °C a dále 1XSSC, 1 % SDS po 30 min při 62 °C. DNA z pozitivních klonů byla štěpena restričními endonukleázami Bam HI, SphI nebo SstI a výsledné fragmenty byly subklonovány do pUC119 a potom sekvenovány.

Použitím sondy PCR 7 byly získány klony, obsahující exony, kodující aminokyseliny 40–176 a tyto klony jsou uloženy v ATCC (deponč. 40681). K získání klonů pro další SCF exony byla lidská genomová knihovna screenována ribosondou 2 a oligonukleotidovou sondou 235–29. Knihovna byla screenována do určité míry stejně jako předchozí s následujícími výjimkami:

hybridizace sondou 235-29 byla provedena při 37 °C a 1 h při 44 °C. Pozitivní klony byly rescreenovány ribosondou 2, ribosondou 3 a oligonukleotidovými sondami 235-29 a 236-31. Ribosondy 2 a 3 byly vyrobeny podle stejného postupu, který byl použit k výrobě ribosondy 1 s následujícími výjimkami: a) rekombinantní pGEM3:hSCF plasmidová DNA byla linearizována restriční endonukleázou PvuII (ribosonda 2) nebo PstI (ribosonda 3) a b) k syntéze ribosondy 3 byla použita SP6 RNA polymeráza (Promega).

Obr. 15A představuje strategii použitou k sekvenování lidské genomové DNA. Na tomto obrázku křivka nahoře představuje oblast lidské genomové DNA kodující SCF. mezery ve křivce indikují oblasti, které nebyly sekvenovány. Velké rámečky představují exony, kodující oblast SCF genu s odpovídajícími kodovanými aminokyselinami uvedenými nad každým rámečkem. Sekvence lidského SCF genu je uvedena na obr. 15B. Sekvence lidské SCF cDNA získané PCR technikou je uvedena na obr. 15C.

F. Sekvence lidské SCF cDNA 5' oblasti

Sekvenování produktů PCR primovaných dvěma genově specifickými primery, odhalilo sekvenci oblasti ohraničené 3' koncem dvou primerů. Jednostranná PCR, jak ukazuje příklad 3A, může přinést sekvenci sousedních oblastí. Jednostranné PCR bylo použito k poskytnutí sekvence 5'-netranskriptovatelné oblasti lidské SCF cDNA.

První řetězec cDNA byl připraven z poly+ RNA z lidské buněčné linie karcinomu měchýře 5637 (ATCC HTB 9) za použití oligonukleotidů 228-28 (obr. 12C) jako primerů, jak popisuje

příklad 3D. Konec této cDNA s dG zbytky s následující jednostrannou PCR cyklů amplifikací používajících primerů, obsahujících)dC)_n sekvence v kombinaci se SCF -specifickými primery, neposkytl cDNA fragmenty, poskytující ve směru (5') známé sekvence.

Malé množství sekvenční informace bylo získáno z PCR amplifikace produktů syntézy druhého řetězce primovaného oligonukleotidem 228-28. Nepřípevněný 5637 první řetězec cDNA popsán výše (okolo 50 ng) a 2 pmol 228-28 byly inkubovány s Klenow polymerázou a 0,6 mM každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP při 10 až 12 °C po 30 minut v 10 µl 1xNick-translačního pufru (Maniatis a spol., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Amplifikace výsledné cDNA sekvenčními jednostrannými PCR s primerem 228-29 v kombinaci s usazenými SCF primery (v pořadí použití: 235-30, 235-14, 236-31 a konečně 235-29) přinesly komplexní směs produktů, které se jeví jako skvrny na agarózovém gelu. Významné zvýšení SCF cDNA fragmentů bylo indikováno zvýšením intenzity proužku, specifického produktu pozorovaného, když srovnatelné objemy úspěšných produktů jednostranné PCR byly amplifikovány se dvěma SCF primery (227-29 a 235-29, např. poskytlo produkty o 150 bp). Pokusy selektovat výhodné rozmezí velikostí produktů rozštěpením skvrn na agarózovém gelu a reamplifikací PCR ve většině případů neposkytlo dobře definované proužky, obsahující sekvence, týkající se SCF.

Jedna reakce PCR 16.17, která obsahovala pouze 235-29 primer, poskytla proužek, který patrně vznikl z primování 235-29 v neznámém místě 5' kodující oblasti vedle očekávaného místa, jak ukazuje mapování restrikcí enzympy PvuII a PstI a PCR analýzy s usazenými primery. Tyto produkty byly gelově

čištěny a reamplifikovány s primery 235-29 a sekvenování bylo zkoušeno Sangerovou Dideoxymetodou za použití ^{32}P značeného primeru 228-30. Výsledná sekvence bází pro označení oligonukleotidu 254-9 (obr. 12B). Když tento 3' řízený primer byl použit v následující PCR v kombinaci s 5' řízenými SCF primery, byly získány proužky očekávané velikosti. Přímé sekvenování dle Sangera takových PCR produktů poskytlo nukleotidy 180 až 204 lidské SCF cDNA sekvence, obr. 15C.

Za účelem získání více sekvencí na 5' konci hSCF cDNA, byl první řetězec cDNA připraven ze 5637 polyA+ RNA (asi 300 μg) použitím SCF specifického primeru (2 pmol 233-14) v 16 μl reakční směsi, obsahující 0,2 j. MMLV reverzní transkriptázy (získané z BRL) a 500 μM každé dNTP. Po standardní fenol-chloroformové a chloroformové extrakci a srážení ethanolem (z 1M octanu amonného), byly nukleové kyseliny resuspendovány ve 20 μl vody, umístěny do vařicí vodné lázně na 5 minut, pak chlazeny s terminální transferázou za přítomnosti 8 μM dATP v pufru, obsahujícím CoCl_2 (Deng a Wu, Methods in Enzymology, 100, str. 96-103). Produkt (dA)_n-koncem opatřený první řetězec cDNA byl čištěn extrakcí fenol-chloroformem a srážen ethanolem a resuspendován ve 20 μl 10 mM tris, pH 8,0 a 1 mM EDTA.

Obohacení a amplifikace lidského SCF, týkající se 5' koncových fragmentů cDNA z asi 20 μg (dA)_n-koncem opatřené 5637 cDNA bylo provedeno následovně: počátečních 26 cyklů jednostranné PCR bylo provedeno za přítomnosti SCF specifického primeru 236-31 a primeru nebo směsi primerů, obsahující (dT)_n sekvence u nebo blízké 3' konci, například primer 221-12 nebo směs primerů 220-3, 220-4 a 220-11 (obr.12C). Produkty (1 μl) těchto PCR byly pak amplifikovány

ve druhé sadě PCR, obsahující primery 221-12 a 235-29. Proužek hlavního produktu přibližně 370 bp byl pozorován v každém případě analýzy na agarózovém gelu. Gelový výřez, obsahující část tohoto proužku, byl vypíchnut z gelu špičkou Pasteurovy pipety a přemístěn do suché mikrozkušavky. Bylo přidáno 10 μ l vody a výřez byl roztaven při 84 °C v tavném bloku. PCR, obsahující primery 221-12 a 235-29 (8 pmol oba) ve 40 μ l bylo naočkováno 2 μ l roztaveného, zředěného gelového výřezu. Po 15 cyklech byl viditelný nepatrný difuzní proužek přibližně 370 bp při analýze na agarózovém gelu. Gelové výřezy, obsahující části tohoto proužku, byly vyjmuty z gelu špičkou Pasteurovy pipety a přemístěny do malé zkumavky pro odstředivku. 10 μ l vody bylo přidáno a výřez byl roztaven při 84 °C v topném bloku. PCR, obsahující primery 221-12 a 235-29 (8 pmol každý) ve 40 μ l byl naočkován 2 μ l roztaveného, zředěného gelového výřezu. Po 15 cyklech byl pozorován nepatrný difuzní proužek přibližně 370 bp při analýze na agarózovém gelu. Asymetrické PCR byly provedeny, aby se generoval horní a dolní konec řetězce sekvenovaných templátů: pro každou reakci 4 μ l PCR reakčního produktu a 40 pmol buď primeru 221-12 nebo primeru 235-29 v celkovém reakčním objemu 10 μ l bylo podrobeno 25 cyklům PCR (1 minuta, 95 °C, 30 sekund 55 °C, 40 sekund 72 °C). Přímé sekvenování 221-12 směsi primovaných PCR produktů (po standardní extrakci a ethanolovém srážení) se ^{32} P-značeným primerem 262-13 (obr.12B) poskytlo 5' sekvenci nukleotidů 1-179 (obr. 15C).

6. Amplifikace a sekvenování lidské genomové DNA v místě prvního kodujícího exonu faktoru kmenových buněk

Screening lidské genomové knihovny SCF oligonukleotidovými sondami neodhalil žádné klony, obsahující

známou část prvního kódujícího enzymu. Pokus byl pak iniciován použitím jednostrané PCR techniky k amplifikaci a klonování genomových sekvencí, obklopujících tento exon.

Prodloužení primerem teplem denaturované lidské placentární DNA (získané od Sigma) bylo provedeno DNA polymerázou (Klenow enzym, dlouhý fragment, Boehringer Mannheim) za použití ne-SCF primeru jako je 228-28 nebo 221-11 za nenáročných (nízká teplota) podmínek jako je 12 °C, pro usnadnění primingu na velkém množství různých míst. Každá reakční směs byla pak zředěna 5x do TaqI DNA polymerázového pufru, obsahujícího TaqI polymerázu a 100 µM každého z dNTP a elongace DNA řetězců byla prováděna při 72 °C po 10 minut. Produkt byl pak obohacen první exonovou sekvencí pro faktor kmenových buněk pomocí PCR za přítomnosti SCF prvního exonového oligonukleotidu (jako je 254-9) a vhodného ne-SCF primeru (228-29 nebo 221-11). Elektroforéza na agarosovém gelu odhalila, že většina produktů byla krátkých (menších než 300 bp). K obohacení druhů byla část každého agarosového gelového proužku odpovídajícího délce větší než 300 bp vyříznuta a elektroforeticky eluována. Po ethanolovém srážení a znovu rozpuštění ve vodě byly gelově přečištěné PCR produkty klonovány do derivátů pGEM4, obsahujících SfiI místo jako HindIII až SfiI fragment.

⁰Klonie byly screenovány ³²P značeným prvním exonovým oligonukleotidem SCF. Bylo identifikováno několik pozitivních kolonií a sekvence inzertů byly získány Sangerovou metodou. Výsledná sekvence, která je v protisměru k prvnímu exonu přes dohodnutou hranici exon-intron, do nejbližšího intronu, je uvedena na obr. 15B.

H. Amplifikace a sekvenování SCF cDNA kodující oblasti z myši, opice a psa.

První řetězec cDNA byl připraven z celkové RNA nebo poly+ RNA z opičích jater (získaných od Clontech) a z buněčných linií NIH-3T3 (myš, ATCC CRL 1658) a D17 (pes, ATCC CCL 183). Primer použitý v syntéze prvního řetězce cDNA byl buď nespecifický primer 228-28 nebo SCF primer (227-30, 237-19, 237-20, 230-25 nebo 241-6). PCR amplifikace s primerem 227-29 a jedním z primerů 227-30, 237-19 nebo 237-20 poskytla fragment očekávané velikosti, který byl sekvenován buď hned nebo po klonování do V19.8 nebo pGEM vektoru.

Další sekvence blízké 5' konci SCF cDNA byly získány PCR amplifikacemi za využití SCF-specifických primerů v kombinaci buď 254-9 nebo 223-29. Další sekvence na 3' konci SCF kodující oblasti byly získány po PCR amplifikaci cDNA primované 238-25 (v tomto případě myši) nebo cDNA primované 241-6 (v tomto případě opičí) s buď 230-25 nebo 241-6 jak je to vhodné a 3' řízeným SCF primerem. Žádné proužky SCF PCR produktu nebyly získány ve stejných pokusech amplifikovat D17 cDNA. Nespecifický primer 228-28 byl použit k primování syntézy prvního řetězce z D17 celkové RNA a výsledná komplexní směs produktu byla obohacena SCF se týkajícími sekvencemi pomocí PCR se 3' řízenými SCF primery, jako je 227-29 nebo 225-31 v kombinaci s 228-9. Směs produktu byla štěpena SfiI a klonována do derivátů pGEM4 (Promega, Madison, Wisconsin), obsahujících SfiI místo jako je fragment od SfiI místa štěpení do tupého konce fragmentu. Výsledná heterogenní knihovna byla screenována radioaktivně značeným 237-20 a několik pozitivních klonů bylo sekvenováno a přineslo sekvenci 3' konce psího SCF. Seřazené aminokyselinové sekvence lidského (obr. 42), opičího,

psího, myšího a krysího SCF zralého proteinu je zobrazena na obr. 16.

Známé SCF aminokyselinové sekvence jsou vysoce homologní ve většině jejich délky. Identické souhlasné sekvence signálního peptidu jsou přítomny v kodující oblasti všech pěti druhů. Aminokyselina očekávaná na konci zralého proteinu podle analogie s krysím SCF je označena na tomto obrázku číslem 1. Psí cDNA sekvence obsahuje nejasnost, která se projevuje dvojnásobností valin/leucin v aminokyselinové sekvenci v kodonu 164. Lidská, opičí, krysí a myší aminokyselinová sekvence koaligují bez inzercí a delecí. Psí sekvence má jeden zvláštní zbytek v poloze 120 ve srovnání s jinými druhy. Lidský a opičí se liší pouze v jedné poloze konzervativním nahrazením valinu (lidský) alaninem (opičí) v poloze 130. Předpokládaná SCF sekvence bezprostředně před a po domnělém zpracování místa blízko zbytku 164 je vysoce mezi druhy konzervována.

Příklad 4

Expres rekombinantního SCF v COS-1 buňkách

Pro transientní expresi v COS-1 buňkách (ATCC CNL 1650) byl transfektován vektor V19.8 (příklad 3C), obsahující krysí SCF¹⁻¹⁶² a SCF¹⁻¹⁹³ geny duplicitně na 60mm plotny (Wigler a spol., Cell, 14, 725-731 (1978)). Plasmid V19.8 SCF je uveden na obr. 17. Vektor bez inzertu byl také pro kontrolu transfektován. Tkáňová kultura supernatantů byla odebrána v různém čase po transfekci a byla zkoušena její biologická aktivita. Tabulka 4 sumarizuje výsledky HPP-CFC biozkušky a tabulka 5 sumarizuje MC/9 dínem získaná data z typického transfekčního experimentu. Výsledky biozkušky supernatantů z COS-1 buněk transfektovaných následujícími plasmidy, jsou

uvedeny v tabulce 4 a 5: koncový okleštěný tvar kryšího SCF s
 C-koncem v aminokyselinové poloze 162 (V19.8 kryší 1-162)
 SCF¹⁻¹⁶², obsahující kyselinu glutamovou v poloze 81 ^{6.19.8} ~~[vst-6]~~
 kryší SCF¹⁻¹⁶² (Glu81)] a SCF¹⁻¹⁶², obsahující alanin v poloze
¹⁹ ~~16~~ [V19.8 kryší SCF 1-162 (Ala 19)]. Aminokyselinové
 substituce byly produktem PCR reakcí provedených v amplifikaci
 kryšího SCF¹⁻¹⁶², jak ukazuje příklad 3. Jednotlivé klony
 V19.8 kryšího SCF¹⁻¹⁶² byly sekvenovány a u dvou klonů byla
 nalezena aminokyselinová substituce. Jak je zřejmé z tabulek 4
 a 5, je rekombinantní kryší SCF aktivní v biozkouškách
 použitých k čištění přírodního savčího SCF v příkladu 1.

Tabulka 4

HPP-CFC zkouška COS-1 supernatantů z buněk transfektovaných
kryší SCF DNA

Vzorek	objem zkoušeného CM (μ l)	kolonie č./200000 buněk
V19.8 (bez inzertu)	100	0
	50	0
	25	0
	12	0
V19.8 kryší SCF ¹⁻¹⁶²	100	>50
	50	>50
	25	>50
	12	>50
	6	30
	3	8
V19.8 kryší SCF ¹⁻¹⁶² (Glu81)	100	26
	50	10
	25	2
	12	0
V19.8 kryší SCF ¹⁻¹⁶² (Ala19)	100	41
	50	18
	25	5
	12	0
	6	0
	3	0

Tabulka 5

MC/9³H-thyminové absorpce v COS-1 supernatantech z buněk transfektovaných krysí SCF DNA

Vzorek	objem zkoušeného kultiv.media (μl)	cpm
V19.8(bez inzertu)	25	1,936
	12	2,252
	6	2,182
	3	1,682
V19,8 SCF ¹⁻¹⁶²	25	11,648
	12	11,322
	6	11,482
	3	9,638
V19.8 SCF ¹⁻¹⁶² (Glu81)	25	6,220
	12	5,384
	6	3,692
	3	1,980
V19.8 SCF ¹⁻¹⁶² (Ala19)	25	8,396
	12	6,646
	6	4,566
	3	3,182

Rekombinantní krysí SCF a jiné faktory byly testovány jednotlivě v lidské CFU-GM (Broxmeyer a spol., supra (1977)) zkoušce, která měří proliferaci buněk normální kostní dřeně a data jsou ukázána v tabulce 6. Výsledky pro COS-1 supernatanty

z kultur 4 dny po transfekci V19.8 SCF¹⁻¹⁶² v kombinaci s jinými faktory, jsou také uvedeny v tabulce 6. Množství kolonií je průměrný počet ze tří kultur.

Rekombinantní krysí SCF má v první řadě synergistickou aktivitu na normální lidskou kostní dřeň v CFU-GM zkoušce. V experimentu v tabulce 6 byl SCF synergistou 1 lidskému GM-CSF, lidskému IL-3 a lidskému CSF-1. V další zkoušce byl také pozorován synergismus s G-CSF. Byla pozorována určitá proliferace lidské kostní dřeně po 14 dnech a krysím SCF ; skupiny buněk se skládaly z < 40 buněk. Stejně výsledky byly získány v přírodním savčím SCF.

Tabulka 6

Lidská CFU-GM zkouška COS-1 supernatantů z buněk transfektovaných krysí SCF DNA

Vzorek	kolonie č./100000 buněk ($\pm$ SEM)
salinický	0
GM-SCF	7 $\pm$ 1
G-SCF	24 $\pm$ 1
IL-3	5 $\pm$ 1
CSF-1	0
SCF ¹⁻¹⁶²	0
GM-CSF + SCF ¹⁻¹⁶²	29 $\pm$ 6
G-CSF + SCF ¹⁻¹⁶²	20 $\pm$ 1
IL-3 + SCF ¹⁻¹⁶²	11 $\pm$ 1
CSF-1 + SCF ¹⁻¹⁶²	4 $\pm$ 0

Příklad 5

Expres rekombinantního SCF v buňkách ovaria čínského křečka

Tento příklad se týká stálých savčích expresních systémů pro sekreci SCF z CHO buněk (ATCC CCL 61 selektovaných DHFR-).

A. Rekombinantní krysí SCF

Expresní vektor použitý pro produkci SCF byl V19.8 (obr. 17). Selektující marker použitý pro zjištění stálých transformantů byl gen pro dihydrofolát reduktázu v plasmidu pDSVE.1. Plasmid pDSVE.1 (obr. 18) je derivátem pDSVE konstruovaný stěpením pDSVE restričním enzymem SalI a ligací k oligonukleotidovému fragmentu, obsahujícímu dva oligonukleotidy

5' TCGAC CCGGA TCCC 3'
3' G GGCCT AGGG AGCT 5'.

Vektor pDSVE je popsán v US přihláškách č. 025344 a 152045, uvedených zde jako odkaz. Část vektoru V19.8 a pDSVE.1 obsahuje dlouhé úseky, které jsou homologní, zahrnující v to bakteriální ColE1 původ replikace a gen pro ampicilinovou rezistenci a SV40 původ replikace. Tyto přesahující úseky mohou přispět k homologní rekombinaci během transformačního procesu a takto usnadňují ko-transformaci.

Byly připraveny kalciumfosfátové ko-sraženiny V19.8 SCF konstruktů a pDSVE.1 za přítomnosti nebo nepřítomnosti 10 µg přenašečové myši použitím 1,0 nebo 0,1 µg pDSVE.1, který byl linearizován restriční endonukleázou PvuI a 10 µg V19.8 SCF

jak popisuje Wigler a spol., *supra* (1978). Kolonie byly selektovány vzhledem k expresi DHFR genu z pDSVE.1. Kolonie schopné růstu bez přídavku hypoxanthinu a thymidinu byly vybrány použitím klonovacích válců a rozšiřovány jako nezávislé buněčné linie. Buněčné supernatanty z jednotlivých buněčných linií byly testovány v MC/9 ^3H -thymidinové absorpční zkoušce. Výsledky z charakteristického experimentu jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7

Zkouška absorpce ^3H -thymidinu ze stabilních CHO buněk

Transfektovaná DNA	objem zkoušeného kondicionovaného media	cpm
V19.8 SCF ¹⁻¹⁶²	25	22,926
	12	34,973
	6	30,657
	3	14,714
	1,5	7,160
žádná	25	694
	12	1,082
	6	880
	3	672
	1	1,354

B. Rekombinantní lidský SCF

Expresce SCF v CHO buňkách byla také dosažena použitím expresního vektoru pDSVR α 2, který je popsán v US přihlášce č. 501904 podané 29.3.1990, která je zde uvedena jako odkaz.

Tento vektor obsahuje gen pro selekci a amplifikaci klonů založených na expresi DHFR genu. Klon pDSR α 2 SCF byl získán dvoustupňovým způsobem. V19.8 SCF byl štěpen restriční enzymem BamHI a SCF izert byl ligován do BamHI místa pGEM3. DNA z pGEM3 SCF byla štěpena s HindIII a SalI a ligována do pDSR 2 štěpeného HindIII a BalI. Stejný postup byl opakován pro lidské geny kodující COOH-konec aminokyselinových poloh 162, 164 a 183 sekvence uvedené na obr. 15C a polohy 248 sekvence uvedené na obr. 42. Stabilizované buněčné linie byly stimulovány methotrexátem (Shimke, Methods in Enzymology, 151 85-104 (1987)) při 10 nM pro zvýšení hladin exprese DHFR genu a sousedního SCF genu. Hladiny exprese rekombinantního lidského SCF byly zkoušeny radioimunostudií jako v příkladu 7 a/nebo indukci tvorby kolonií in vitro za použití lidských periferních krevních leukocytů. Tato studie se provádí jak je popsáno v příkladu 9 (tabulka 12) s tím rozdílem, že se použije periferní krev místo kostní dřeně a inkubace se provádí při 20 % O₂, 5 % CO₂ a 75 % N₂ za přítomnosti lidského EPO (10 j/ml). Výsledky z typických pokusů jsou uvedeny v tabulce 8. CHO klon exprimující lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ byl deponován 25.zář. 1990 v ATCC (CRL 10557) a označen Hu164SCF17.

Tabulka 8

Zkouška hPBL kolonií kondicionovaného media ze stabilních CHO buněčných linií transfektovaných lidskou SCF DNA

Transfektovaná DNA	zkoušené medium (μ l)	počet kolonií/ 10 ⁵
pDSR α 2hSCF ¹⁻¹⁶⁴	50	53
	25	45
	12,5	27
	6,25	13
pDSR α hSCF ¹⁻¹⁶²	10	43
	5	44
	2,5	31
	1,25	17
	0,625	21
žádná (CHO kontrola)	50	4

Příklad 6

Exprese rekombinantního SCF v E.coli

A. Rekombinantní krysí SCF

Tento příklad se týká exprese v E.coli SCF polypeptidů pomocí DNA sekvence, kodující (Met⁻¹) krysí SCF 1-193 (obr.14C). I když může být použit jakýkoliv vhodný vektor pro expresi proteinu za použití této DNA, užitý plasmid byl pCFM156 (obr. 19). Tento plasmid může být snadno konstruován z pCFM 836 (viz US patent č. 4710473. který je zde uveden pro úplnost jako odkaz) rozrušením na dvou endogenních NdeI

restrikčních místech zaplněním konce T4 polymerázovým enzymem s následující ligací tupého konce a substitucí malé DNA sekvence mezi jedinečná ClaI a KpnI restrikční místa malým oligonukleotidem uvedeným dále.

5'CGATTTGATTCTAGAACGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3'
3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'

Rízení exprese proteinu v pCFM1156 plasmidu je pomocí syntetického lambdy P_L promotoru, který je sám pod kontrolou teplotně citlivého lambda CI857 represorového genu (jaký je poskytován ve kmenech E.coli FMS (ATCC dep.číslo 53911 nebo K12 Htrp). pCFM1156 vektor je konstruován tak, aby měl DNA sekvenci, obsahující optimální ribosomová vazebná místa a iniciační kodon přímo 3' syntetického PL promotoru. Unikátní NdeI restrikční místo, které obsahuje AT6 iniciační kodon, předchází multirestrikční místo klonující skupiny následované lambda t-cop transkripční stop sekvencí.

Plasmid V19.8 SCF¹⁻¹⁹³, obsahující krysí SCF¹⁻¹⁹³ gen klonovaný z PCR amplifikované cDNA (obr. 14C), jak popisuje příklad 3 byl štěpen BglII a AclII a 603 bp DNA fragment byl izolován. Pro poskytnutí Met iniciačního kodonu a obnovení kodonů pro první tři aminokyselinové zbytky (Gln, Glu a Ile) krysího SCF polypeptidu, byl vyroben syntetický oligonukleotidový linker

5' TATGCACCA 3'
3' ACGTCCTCTAG 5'

s NdeI a BglII lepivými konci. Malý oligonukleotid a krysí SCF¹⁻¹⁹³ genový fragment byly vloženy ligací do pCFM156 v

unikátních NdeI a SstII místech plasmidu uvedených na obr. 19. Produktem této reakce je expresní plasmid, pCFM1156 krysí SCF¹⁻¹⁹³.

pCFM1156 krysí SCF¹⁻¹⁹³ plasmid byl transformován do kompetentních FMS E.coli hostitelských buněk. Selektce buněk, obsahujících plasmid, byla na bázi markerového genu pro antibiotickou rezistenci (kanamycin) přenášenou pCFM1156 vektorem. Plasmidová DNA byla izolována z kultivovaných buněk a DNA sekvence syntetického oligonukleotidu a jeho spojení s krysím SCF genem bylo potvrzeno DNA sekvenováním.

Pro konstrukci plasmidu pCFM1156 krysí SCF¹⁻¹⁶² kodujícího (Met⁻¹) krysí SCF¹⁻¹⁶² polypeptid, byl izolován restriční fragment od EcoRI k SstII z V19.8 krysího SCF a vložen ligací do plasmidu pCFM krysího SCF¹⁻¹⁹³ v unikátních restričních místech EcoRI a SstII a takto se nahradí kodující oblast pro karboxylový konec krysího SCF genu.

Pro konstrukci plasmidů pCFM1156 krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ a pCFM1156 krysího SCF¹⁻¹⁶⁵, kodujících (Met⁻¹) krysí SCF¹⁻¹⁶⁴ a (Met⁻¹) krysí SCF¹⁻¹⁶⁵, byly izolovány EcoRI až SstII restriční fragmenty z PCR amplifikované DNA, kodující 3' konec SCF genu a byly označeny pro zavedení místně řízených změn v DNA v oblasti, kodující karboxylový konec SCF genu. DNA amplifikace byly provedeny použitím oligonukleotidových primerů 227-29 a 237-19 v konstrukci pCFM1156 krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ a 227-29 a 237-20 v konstrukci pCFM1156 krysího SCF¹⁻¹⁶⁵.

B. ²Rekombinantní lidský SCF

Tento příklad se týká exprese v E.coli lidského SCF

polypeptidu pomocí DNA sekvence, kodující (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ a (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁸³ (obr. 15C). Plasmid V19.8 lidského SCF¹⁻¹⁶², obsahující lidský SCF¹⁻¹⁶² gen byl použit jako templát pro PCR amplifikace lidského SCF genu. Oligonukleotidové primery 227-29 a 237-19 byly použity ke generování PCR DNA, která pak byla štěpena PstI a SstII restrikcí endonukleázami. Za účelem získání Met iniciačního kodonu a obnovy kodonů pro první čtyři aminokyselinové zbytky (Glu, Gly, Ile, Cys) lidského SCF polypeptidu, byl připraven syntetický oligonukleotidový linker

5'	TATGGAAGGTATCTGCA	3'
3'	ACCTTCATAG	5'

s NdeI a PstI lepivými konci. Malý oligolinker a PCR odvozený genový fragment lidského SCF genu byly vloženy ligací do expresního plasmidu pCMF1156 (jak již bylo popsáno) v unikátních NdeI a SstII místech v plasmidu, jak je uvedeno na obr. 19.

pCFM lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ plasmid byl transformován do kompetentních FMS E.coli hostitelských buněk. Selekcce na plasmid obsahující buněčné hostitele byla provedena na bázi markerového genu pro antibiotickou rezistenci (kanamycin) přenášeném na pCMF1156 vektoru. Plasmidová DNA byla izolována z kultivovaných buněk a DNA sekvenováním byla potvrzena DNA sekvence lidského SCF genu.

Ke konstrukci plasmidu pCFM1156 lidského SCF¹⁻¹⁸³ kodujícího (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁸³ (obr. 15C) byl izolován EcoRI až HindIII restrikcí fragment, kodující karboxylový konec lidského SCF genu z pCEM lidského SCF¹¹⁴⁻¹⁸³ (popsaného

dále) a SstI až EcoRI restriční fragment, kodující aminokonec lidského SCF genu, z pCFM1156 lidského SCF¹⁻¹⁶⁴, a byl též izolován restriční fragment z pCFM1156. Tři DNA fragmenty byly spolu ligovány za vzniku pCFM1156 lidského SCF¹⁻¹⁸³ plasmidu, který byl pak transformován do FM5 E.coli hostitelských buněk. Po selekci kolonií použitím rezistence na kanamycin, byla plasmidová DNA izolována a opravená DNA sekvence byla potvrzena DNA sekvenováním. pCFM1156 lidský SCF¹¹⁴⁻¹⁸³ plasmid je odvozen od pGEM3, který obsahuje EcoRI-SphI fragment, který zahrnuje nukleotidy 609-820 lidské SCF cDNA sekvence uvedené na obr. 15C. EcoRI-SphI inzert v tomto plasmidu byl izolován z PCR, která využívala oligonukleotidové primery 225-31 a 241-6 (obr. 12B) a PCR 22.7 (obr. 13B) jako templát. Sekvence primeru 241-6 byla založena na lidské genomové sekvenci na 3' straně exonu, obsahujícího kodon pro aminokyselinu 176.

C. Fermentace E.coli, produkujících lidský SCF¹⁻¹⁶⁴

Fermentace pro přípravu SCF 1-164 byly prováděny v 16litrových fermentorech za použití E.coli K12 hostitele, obsahujícího plasmid pCFM 1156 lidského SCF¹⁻¹⁶⁴. Zásobní očkovací materiál pro produkční kulturu byl udržován při -80 °C v 17% glycerolu v Luria půdě. Pro produkci inokula bylo 100 µl rozmraženého zásobního materiálu přeneseno do 500 µl Luria půdy ve 2litrové Erlenmeyerově baňce a ponecháno růst přes noc při 30 °C na rotační třepačce (250 ot.min⁻¹).

Pro produkci pasty buněk E.coli použité jako výchozí materiál pro čištění lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ v tomto příkladu, byly použity následující fermentační podmínky.

Kultura inokula byla asepticky přenesena do 16litrového fermentoru, obsahujícího 8litrovou vsádku media (viz tabulka 9). Kultura byla kultivována vsádkovým způsobem dokud OD-600 kultury nebylo 3,5. V této době bylo zavedeno sterilní živné medium 1, tabulka 10) do fermentoru za použití peristaltického čerpadla pro řízení rychlosti živin. Rychlost živného media byla exponenciálně s časem zvyšována do dosažení rychlosti růstu $0,15 \text{ h}^{-1}$. Teplota byla udržována na 30°C během růstové fáze. Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve fermentoru byla automaticky udržována na 50 % nasycení za použití rychlosti průtoku vzduchu, rychlosti míchání, tlaku v nádobě a doplňování kyslíku; pH ve fermentoru bylo automaticky řízeno na 7,0 za použití kyseliny fosforečné a hydroxidu amonného. Při OD-600 přibližně 30, byla indukována produkční fáze fermentace zvýšením fermentační teploty na 42°C . V této době byl ukončen přidavek živin 1 a bylo zahájeno přidávání živin 2 (tabulka 11) rychlostí 200 ml/h. Přibližně šest hodin po zvýšení teploty fermentoru byl obsah fermentoru ochlazen na 15°C . Výtěžek SCF¹⁻¹⁶⁴ byl vytěžen v množství 30 mg OD-L. Buněčné pelety pak byly získány odstředěním v Beckmanově J6-B rotoru při 3000 x g po dobu jedné hodiny. ⁴Buněčná pasta byla uchovávána zmrazená při -70°C .

Výhodná metoda pro produkci SCF¹⁻¹⁶⁴ je podobná metodě popsané výše s tou výjimkou, že byly provedeny následující modifikace:

- 1) Nezačne přidávání živin 1 dokud OD-600 kultury nedosáhne 5-6.
- 2) Rychlost přidávání živin 1 je zvyšována pomaleji, což vede k pomalejší rychlosti růstu (přibližně 0,08).
- 3) Kultura je indukována při OD-600 ^{pomě}(20).
- 4) Živiny 2 jsou zaváděny do fermentoru rychlostí 300 ml/h.

Všechny ostatní operace jsou stejné jako u výše popsaného postup včetně medií.

Za použití těchto postupů byly získány výtěžky SCF¹⁻¹⁶⁴ přibližně 35-40 mg/OD-L při OD=25.

Tabulka 9

Složení vsádkového media

kvasničný extrakt	10 ^a g/l
glukoza	5
K ₂ HPO ₄	3,5
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
NaCl	0,625
Dow P-2000, protipěnová přísada	5 ml/8 l
vitaminový roztok ^b	2 ml/l
roztok stopových kovů ^c	2 ml/l

^aPokud není uvedeno jinak, jsou všechny složky míněny jako g/l.

^bRoztok stopových kovů: FeCl₃.6H₂O 27 g/l, ZnCl₂.4H₂O 2 g/l, CaCl₂.6H₂O 2 g/l, Na₂MoO₄.2H₂O 2 g/l, CuSO₄.5H₂O 1,9 g/l, koncentrovaná HCl, 100 ml/l.

^cVitaminový roztok: riboflavin 0,42 g/l, kyselina panthothénová 5,4 g/l, niacin 6 g/l, pyridoxin 1,4 g/l, biotin 0,06 g/l, kyselina listová 0,04 g/l.

Tabulka 10

Složení živného media

kvasničný extrakt	50 ^a
glukóza	450
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
roztok stopových kovů ^b	10 ml/l
vitaminový roztok ^c	10 ml/l

^aPokud není uvedeno jinak, jsou všechny složky míněny jako g/l.

^bRoztok stopových kovů: FeCl₃·6H₂O 27 g/l, ZnCl₂·4H₂O 2 g/l, CaCl₂·6H₂O 2 g/l, Na₂MoO₄·2H₂O 2 g/l, CuSO₄·5H₂O 1,9 g/l, koncentrovaná HCl, 100 ml/l.

^cVitaminový roztok: riboflavin 0,42 g/l, kyselina panthothenová 5,4 g/l, niacin 6 g/l, pyridoxin 1,4 g/l, biotin 0,06 g/l, kyselina listová 0,04 g/l.

Tabulka 11

Složení živného media 2

trypton	172 ^a
kvasničný extrakt	86
glukoza	258

^avšechny složky jsou uváděny v g/l.

Příklad 7

Imunozkouška detekce PCR

Radioimunoeseje (RIA) byly použity pro kvantitativní detekci SCF ve vzorcích a byly provedeny následujícím způsobem.

SCF přípravek z BRL 3A buněk čištěný jako v příkladu 1 byl inkubován spolu s antisérem po dvě hodiny při 37 °C. Po dvou hodinách inkubace byly pak zkumavky se vzorky ochlazeny na ledu, byl přidán ^{125}I -SCF a zkumavky byly inkubovány při 4 °C nejméně 20 hodin. Každá zkumavka obsahovala 500 μl inkubační směsi, obsahující 50 μl zředěného antiséra, -60000 cpm ^{125}I -SCF ($3,8 \times 10^7$ cpm/ μg), 5 μl trasyolol a 0,400 μl SCF standardu, s pufrem (fosfátem pufrovaný salinický roztok, 0,1% hovězí serový albumin, 0,05 Triton X-100, 0,025% azid) tvořící zbytek objemu. Antiserum pro druhý test bylo získáno z krve králíků imunizovaných s 50% čistým přípravkem přírodního SCF z BRL 3A kondicionovaného media. Konečné zředění antiséra ve zkoušce bylo 1:2000.

S protilátkou vázaný ^{125}I -SCF byl vysrážen přidavkem 150 μl Staph A (Calbiochem). Po 1 hodině inkubace při teplotě místnosti byly vzorky odstředěny a pelety byly promyty dvakrát 0,75 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,2, obsahujícího 0,15M NaCl, 2 mM EDTA a 0,05 % Tritonu X-100. Promyté pelety byly proměřeny v gama čítači pro stanovení procent ^{125}I -SCF vazeb. Počty vazeb ve zkumavkách postrádajících sérum byly odečítány ze všech konečných hodnot pro korekci nespecifického srážení. Charakteristická RIA je uvedena na obr. 20. Procento inhibice ^{125}I -SCF vazby produkované naznačeným standardem je dávkově

dependentní (obr. 20A) a jak je uvedeno na obr. 20B, při zkouškách pelet, které byly imunoprecipitovány, pomocí SDS-PAGE a autoradiograficky, je pruh ^{125}I -SCF konkurující. Na obr. 20B, je dráha 1 ^{125}I -SCF a dráhy 2,3,4 a 5 jsou imunoprecipitovaný ^{125}I -SCF porovnávaný s 0, 2, 100 a 200 ng SCF standardu. Jak je stanoveno snížením v Δ precipitaci protilátkou v cpm pozorovaném v RIA zkumavkách tak snížením v pruhu imunoprecipitovaného ^{125}I -SCF proteinu (migrující při asi M_r 31000), polyklonální protilátky rozeznává SCF standard, který byl čištěn jako v příkladu 1.

Western postupy byly také aplikovány pro stanovení rekombinantního SCF exprimovaného v E.coli, COS-1 a CHO buňkách. Částečně čištěný E.coli exprimovaný krysí SCF 1-162 a SCF 1-193 jakož i lidský SCF 1-162 (příklady 4 a 9) a CHO buňkou exprimovaný krysí SCF 1-162 (příklad 5), byly podrobeny SDS-PAGE. Při následující elektroforéze byly proteinové pruhy přeneseny na 0,2 μm nitrocelulózu za použití zařízení Bio-Rad Transblot při 60 V po dobu 5 hodin. Nitrocelulózkové filtry byly blokovány po 4 h v PBS, pH 7,6, obsahujícím 10% kozí sérum a dále inkubovány po 14 h při teplotě místnosti s ředěním 1:200 buď králičího preimunního nebo imunního sera (imunizace popsána výše). Komplexy protilátka-antiserum byly vizualizovány za použití reagensů křenová peroxidáza-konjugovaný kozí anti-králičí IgG (Vector laboratories) a 4-chlor-1-naftolu jako činidla vyvíjejícího zbarvení.

Příklady dvou Western analýz jsou uvedeny na obr. 21 a 22. Na obr. 21 jsou dráhy 3 a 5 200 μl COS-1 buňkami produkovaného lidského SCF 1-162, dráhy 1 a 7 jsou 200 μl COS-1 buňkami produkovaného lidského EPO (COS-1 buňky

transfektované sV19.8 EPO) a dráha 8 je drahou markerů molekulové hmotnosti. Dráhy 1-4 byly inkubovány s preimunním sérem a dráhy 5-8 byly inkubovány s imunním sérem. Imunní sérum specificky rozpoznává difúzní pruh s M_r asi 30000 daltonů z COS-1 buněk, produkujících lidský SCF 1-162, ale ne z COS-1 buněk, produkujících lidský EPO.

Ve Western analýze uvedené na obr. 22 dráhy 1 a 7 jsou 1 μ g částečně čištěného přípravku krysího SCF 1-193 produkovaného v E.coli, dráhy 2 a 8 jsou kryší SCF 1-193 produkovaný COS-1 buňkou a čištěný na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků. Dráhy 4 a 9 jsou kryší SCF 1-162 produkovaný COS-1 buňkou čištěný na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků, dráhy 5 a 10 jsou kryší SCF 1-162 produkovaný CHO buňkou a čištěný na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků a dráha 6 jsou zabarvené markery molekulové hmotnosti. Dráhy 1-5 a dráhy 6-10 byly inkubovány s králičím preimunním a imunním sérem. E.coli produkovaný kryší 1-193 (dráhy 1 a 7) migruje při zřejmě M_r 24000 daltonů, zatímco COS-1 buňkou produkovaný kryší SCF 1-193 (dráhy 2 a 8) migruje při M_r 24-36000 daltonů. Tento rozdíl v molekulové hmotnosti je očekávaný, protože savčí buňky, ale ne bakterie, jsou schopné glykosylace. Transfekce sekvence, kódující kryší SCF 1-162 v COS-1 (dráhy 4 a 9) nebo CHO buňkách (dráhy 5 a 10), vede k expresi SCF s nižší průměrnou molekulovou hmotností než je produkován transfekcí s SCF 1-193 (dráhy 2 a 8).

Expresní produkty krysího SCF 1-162 z COS-1 a CHO buněk jsou srtie pruhů v rozmezí zřejmě mol.hmotnosti mezi 24-36000 daltonů. Heterogenita exprimovaného SCF je pravděpodobně způsobena změnami v obsahu karbohydrátů, jelikož SCF polypeptid je glykosylován v různé míře.

Souhrnně Western analýzy indikují, že imunní sérum z králíků imunizovaných s přírodním savčím SCF rozpoznává rekombinantní SCF produkovaný v E.coli, COS-1 a CHO buňkách, ale nerozpoznává jakékoliv pruhy v kontrolním vzorku, obsahujícím COS-1 buňkami produkovaný EPO. Jako další podporu specifity SCF antiséra lze uvést, že preimunní sérum ze stejného králíka nereaguje s jakýmikoliv krysími nebo lidskými SCF expresními produkty.

Příklad 8

In vivo aktivita rekombinantního SCF

A. Krysí SCF při transplantaci kostní dřeně

COS-1 buňky byly transfektovány s V19.8 SCF¹⁻¹⁶² v pokusu ve velkém měřítku (T175 cm² nádoby místo 60 mm misek) způsobem popsaným v příkladu 4. Bylo získáno přibližně 270 ml supernatantu. Tento supernatant byl chromatografován na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků a S-Sepharoze v podstatě stejným způsobem jak je popsáno v příkladu 1. Rekombinantní SCF byl hodnocen v modelu transplantace kostní dřeně na myších W/W^v. Myš W/W^v měla defektní kmenovou buňku, což mimo jiné vede k makrocytové anemii (velké červené krvinky) a umožňuje transplantaci kostní dřeně z normálních živočichů bez potřeby ozařování příjemců (Russel a spol., Science, 144, 844-846 (1964)). Kmenové buňky normálního dárce rostou po transplantaci rychleji než defektní recipientovy buňky.

V následujícím příkladu obsahuje každá skupina šest myší odpovídajícího stáří. Kostní dřeň byla získána z normálních dárcovských myší a transplantována W/W^v myším. Krevní profil příjemců je sledován v různých časech po transplantaci a přihojení kostní dřeně je stanoveno změnami periferních krevních buněk z recipientova fenotypu na donorův. Konverze z recipienta na donorův fenotyp je detegována monitorováním předního "scatter" profilu (FASCAN, Becton Dickenson) červených krvinek. Profil pro každou transplantaci pro každé zvíře byl porovnán s profilem pro kontrolní zvířata jak donora tak recipienta ve stejné době. Porovnání bylo provedeno za

využití počítačového programu založeného na Kolmogorov-Smirnov statistikách pro analýzy histogramů z průtočných systémů (Young, J.Histochem. and Cytochem., 25, 935-941 (1977)). Nezávislým kvantitativním indikátorem přihojení je hemoglobin, detekovaný elektroforézou hemoglobinu příjemcovy krve (Song a spol., Mol. and Cell.Biol., 9, 798-808 (1989)), což je v souladu se závěry statistiky podle Kolmogorova-Smirnova.

Přibližně 3×10^5 buněk bylo transplantováno bez ošetření SCF (kontrolní studie na obr. 23) z C56BL/6J dárců W/W^v příjemcům. Druhá skupina dostala 3×10^5 buněk donora, které byly ošetřeny SCF (600 j/ml) při 37 °C po 20 min a injektovány společně (pre-ošetřená skupina na obr. 23). (Jedna jednotka SCF je definována jako množství, které vede k polovině maximální stimulace v MC/9 biozkoušce). Ve třetí skupině byly recipientní myši injektovány subkutánně (sub-Q) přibližně 400 j SCF/den 3 dny po transplantaci 3×10^5 dárcovských buněk (sub-Q inject skupina na obr. 23). Jak je uvedeno na obr. 23 v obou SCF-ošetřených skupinách je kostní dřeň přihojena rychleji než v neošetřené kontrole. 29 dní po transplantaci byla SCF pre-ošetřená skupina přeměněna na donorův fenotyp. Tyto příklady ilustrují vhodnost SCF terapie při transplantaci kostní dřeně.

B. In vivo aktivita krysího SCF u Steel myší

Mutace v S1 lokusu působí deficienci hematopoetických buněk, pigmentových buněk a zárodečných buněk. Hematopoetický defekt je manifestován jako snížený počet červených krvinek (Russell, Al Gordon, Regulation of Hematopoiesis, sv.I, 649-675 Appleton-Century-Grafts, New York (1970)), neurofilů (Ruscetti, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 152, 398 (1976)), monocytů

(Shibats, J.Immunol. 135, 3905 (1985)), megakaryocytů (Ebbe, Exp.Hematol., 6, 201 (1978)), přirozených zabíječových buněk (Hayashi, Dev.Biol., 109, 234(1985)). Steel myši jsou čistými příjemci transplantátu kostní dřeně pro svoji sníženou schopnost poskytovat kmenové buňky (Bannerman, Prog.Hematol., 8, 131 (1973)). Gen kodující SCF je u Steel myší (S1/S1) vypuštěn.

Steel myši poskytují senzitivní in vivo model pro SCF aktivitu. Různé rekombinantní SCF proteiny byly testovány na Steel-Dickie (S1/S1^d) myších v různě dlouhých časech. Šest až deset týdnů staré Steel myši (WCB6F1-S1/S1^d) byly získány od Jackson Labs, Bar Harbor, ME. Periferní krev byla monitorována mikrobuněčným čítačem SYSMEX F-800 (Baxter, Irvine, CA) na červené krvinky, hemoglobin a destičky. Pro spočtení periferních bílých krvinek (WBC) byl použit Coulter Channelyzer 256 (Coulter Electronics, Marietta, GA).

V pokuse na obr. 24 byly Steel-Dickie myši ošetřeny SCF 1-164 získaným z E.coli, čištěným jako v příkladu 10, v dávce 100 µg/kg/den po 30 dní a pak dalších 20 dní dávkou 30 µg/kg/den. Protein byl formulován v salinickém roztoku pro injekce (Abbott Labs, North Chicago, IL) + 0,1 % fetálního hovězího sera. Injekce byly podávány denně subkutánně. Periferní krev byla monitorována v ocase odebráním 50 µl v časech uvedených na obr. 24. Krev byla vybrána do 3% EDTA povlečených stříkaček a přenesena do mikrofugových zkumavek s práškovým EDTA (Brikmann, Westburry, NY). Existuje výrazná korekce makrocytové anemie u ošetřených zvířat vzhledem ke zvířatům kontrolním. Při ukončení ošetření se ošetřovaná zvířata nevrátila do počátečního stavu makrocytové anemie.

V pokusu uvedeném na obr. 25 a 26 byly Steel-Dickie myši ošetřeny různými rekombinantními formami SCF jak je popsáno výše, ale v dávce 100 µg/kg/den po 20 dnů. Byly produkovány dvě formy z E.coli získaného krysího SCF, SCF¹⁻¹⁶⁴ a SCF¹⁻¹⁹³, jak je popsáno v příkladu 10. Dále byl také testován E.coli SCF¹⁻¹⁶⁴, modifikovaný přídatkem polyethylenglykolu (SCF¹⁻¹⁶⁴PEG25) jako v příkladu 12. Rovněž byl testován z CHO získaný SCF¹⁻¹⁶² produkováný jako v příkladu 5 a čištěný jako v příkladu 11. Zvířata byla podrobena odebrání krve srdeční punkcí stříkačkami se 3 % EDTA a tato byla umístěna do zkumavek s práškovanou EDTA. Profily periferní krve po 20 dnech jsou uvedeny na obr. 23 pro bílé krvinky (WBC) a obr. 26 pro destičky. WBC rozdíly pro skupinu SCF¹⁻¹⁶⁴PEG25 jsou uvedeny na obr. 27. Absolutně jsou zvýšeny neurofily, monocyty, lymfocyty a destičky. Nejdramatičtější efekt je zřejmý s SCF¹⁻¹⁶⁴PEG25.

Nezávislá měření lymfocytů byla rovněž provedena a údaje jsou uvedeny na obr. 28. Myší ekvivalent lidské CD4 nebo marker T helper buněk, je L3T4 (Dialynas, J.Immunol., 131, 2445 (1983)). Lym-2 je myší antigen cytotoxických T buněk (Ledbetter, J.Exp.Med., 153, 1503 (1981)). Monoklonální protilátky vůči těmto antigenům byly použity pro hodnocení T buněčných podskupin u ošetřených zvířat.

Krev byla hodnocena na T lymfocyty následovně. Dvě stě mikrolitrů krve bylo odebráno od jednotlivých zvířat do EDTA ošetřených zkumavek. Každý vzorek krve byl lyzován sterilní deionizovanou vodou po 60 sekund a pak zpracován isotonicky s 10X Dulbecco fosfátovým pufovaným salinickým roztokem PBS (Gibco, Grand Island, NY). Takto lyzované krev byla promyta dvakrát 1X PBS (Gibco, Grand Island, NY) doplněným 0,1 %

fetálního hovězího sera (Flow Laboratory, McLean, VA) a 0,1 % azidu sodného. Každý vzorek krve byl umístěn do misky s 96 jamkami s kulatým dnem a odstředěn. Bělná peleta (obsahující $2-10 \times 10^5$ buněk) byla resuspendována s 20 mikrolitry krysí anti-myší L3T4 konjugovaného s phycoerythrinem (PE) (Becton Dickinson, Mountain View, CA) a 20 μ l krysí anti-myší Lyt-2 konjugovaného s fluoresceinisothiokonjugátem, inkubovaným na ledu (4 °C) po 30 minut (Beckton Dickinson). Následující inkubace buněk byly promyty dvakrát v 1% PBS doplněným jak je uvedeno výše. Každý vzorek krve pak byl analyzován na FACScan cell analytickém systému (Beckton Dickinson, Mountain View, CA). Tento systém byl standardizován za použití standardních autokompenzačních postupů a Calibrita Beads (Beckton Dickinson, Mountain View, CA). Tyto údaje indikují zvýšení jak helper T buněk, tak cytotoxických T buněk.

C. In vivo aktivita SCF u primátů

Lidský SCF 1-164 exprimovaný v *E.coli* (příklad 6) a čištěný do homogenity jako v příkladu 10 byl testován na in vivo biologickou aktivitu u normálních primátů. Dospělí samci paviánů (*Papio sp.*) byli studováni ve třech skupinách: neošetřená, $n=3$, SCF 100 μ g/kg/den, $n=6$, a SCF 30 μ g/kg/den $n=6$. Ošetřená zvířata dostávala jednou denně subkutánní injekce SCF. Zkušební vzorky krve byly získány od zvířat pod ketaminem. Vzorky kompletní krve, retikulocytů a destiček byly získány ve dnech 1, 6, 11, 15, 20 a 25 po ošetření.

Všechna zvířata přežívají a nemají žádnou negativní reakci vzhledem k terapii SCF. Počet bílých krvinek se u zvířat ošetřených 100 μ g/kg zvýšil jak je uvedeno na obr. 29. Rozdílný počet, získaný ručně ze Wright Giemsa vybarvených

skvrn periferní krve, je také uveden na obr. 29. Bylo zde absolutní zvýšení u neutrofilů, lymfocytů a monocytů. Jak je uvedeno na obr. 30 při dávce 100 µg/kg také došlo ke zvýšení hematokrytů a destiček.

Lidský SCF (hSCF¹⁻¹⁶⁴ modifikovaný přídavkem polyetylglykolu jako v příkladu 12) byl také testován na normálních paviánech v dávce 200 µg/kg/den, podávané kontinuálně intravenózní infúzí a porovnán s nemodifikovaným proteinem. Zvířata začala dostávat SCF v den 0 a byla ošetřována 28 dnů. Výsledky periferní WBC jsou uvedeny v následující tabulce. PEG modifikovaný SCF vyvolává časnější zvýšení periferní WBC než nemodifikovaný SCF.

Ošetření 200 µg/kg/den hSCF¹⁻¹⁶⁴:

Zvíře č. M88320		zvíře č. M88129	
den	WBC	den	WBC
0	5800	0	6800
+7	10700	+7	7400
+14	12600	+14	20900
+16	22000	+21	18400
+22	31100	+23	24900
+24	28100	+29	13000
+29	9600	+30	23000
+36	6600	+37	12100
+43	5600	+44	10700

Ošetření 200 µg/kg/den PEG-hSCF¹⁻¹⁶⁴:

Zvíře č. M88350		zvíře č. M89116	
den	WBC	den	WBC
-7	12400	-5	7900
-2	11600	0	7400
+4	24700	+6	16400
+7	20400	+9	17100
+11	24700	+13	18700
+14	32600	+16	19400
+18	33600	+20	27800
+21	25400	+23	20700
+25	16600	+27	20200
+28	26900	+29	18600
+32	9200	+33	7600

Příklad 9

In vitro aktivita rekombinantního lidského SCF

cDNA lidského SCF, odpovídajícího aminokyselinám 1-162 získaná PCR reakcemi jako v příkladu 3D, byla exprimována v COS-bunkách jak je popsáno pro krysí SCF v příkladu 4. COS-1 supernatanty byly zkoušeny na lidské kostní dřeni jakož i v myších HPP-CFC a MC/9 zkouškách. Lidský protein nebyl aktivní při koncentracích testovaných v oborou zkouškách na myších, byl aktivní na lidské kostní dřeni. Kultivační podmínky byly následující: lidská kostní dřěň od zdravých dobrovolníků byla odstředěna nad Ficoll-Hypaque gradienty (Pharmacia) a kultivována ve 2,1% methylcelulóze, 30% fetálním ^mtelecího séra^m, 6×10^{-5} M 2-merkapt ethanolu, 2 mM glutaminu, ISCOVE mediu (GIBCO), 20 j/ml EPO a 1×10^5 buněk/ml po 14 dnů ve zvlhčené atmosféře, obsahující 7 % O₂, 10 % CO₂ a 83 % N₂. Počet kolonií vzniklých s rekombinantními lidskými akrysími SCF COS-1 supernatanty je uveden v tabulce 12. Jsou započteny pouze ty kolonie, které mají velikost 0,2 mm nebo větší.

Tabulka 12

Růst kolonií lidské kostní dřeně jako odezva na SCF

Transfektovaný plasmid	objem CM zkouš. (μl)	kolonie poč./100000 buněk + stand.odch.
V19.8 (bez inzertu)	100	0
	50	0
V19.8 lidský SCF ¹⁻¹⁶²	100	33±7
	50	22±3
V19.8 kryší SCF ¹⁻¹⁶²	100	13±1
	50	10

Kolonie, které rostly během čtrnáctidenního období, jsou uvedeny na obr. 31A (zvětšeno 12x). Šipka upozorňuje na typickou kolonii. Kolonie se podobají koloniím myšího HPP-CFC svými rozměry (průměr 0,5 mm). Díky přítomnosti EPO byly některé kolonie hemoglobinovány. Po izolaci kolonií a odstředění na skleněných destičkách za použití Cytospinu (Shandon) s následujícím vybarvením pomocí Wright-Giemsy, byl převládajícím buněčným typem typ buňky nerozdělené s velkým jádrem: cytoplasma poměrem, jak je uvedeno na obr. 31B (zvětšení 400x). Šipky na obr. 31B představují: šipka 1 - cytoplasma, šipka 2 - jádro, šipka 3 - vakuola. Imaturované buňky jako třída jsou velké a získané buňky jsou menší než zralé (Digs a spol., The Morphology of Human Blood Cells, Abbott Labs, 3 (1978)). Jádra ranných buněk z hematopoetické maturované sekvence jsou relativně velká vzhledem k

cytoplasmě. Dále se cytoplasma imaturovaných buněk zbarvuje pomocí Wright-Giemsey tmavěji než jádro. Jak buňky zrají, je jádro proti cytoplasmě tmavší. Morfologie buněk lidské kostní dřeně vzniklých z kultury s rekombinantním lidským SCF je v souladu se závěry, že konečným produktem a meziproduktem působení SCF je relativně imaturovaný hematopoietický progenitor.

Rekombinantní lidský SCF byl testován zkouškou kolonií na agaru na lidské kostní dření v kombinaci s dalšími růstovými faktory popsány výše. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13. SCF synergizuje s G-CSF, GM-CSF, IL-3 a EPO pro zvýšení proliferace kostní dřeně pro individuální CSF.

Tabulka 13

Synergismus rekombinantního lidského SCF s dalšími faktory stimulujícími lidské kolonie

	kolonie počet/10 ⁵ buněk (14 dní)
slepý pokus	0
hG-CSF	32 ± 3
hG-CSF + hSCF	74 ± 1
hGM-CSF	14 ± 2
hGM-CSF + hSCF	108 ± 5
hIL-3	23 ± 1
hIL-3 + hSCF	108 ± 3
hEPO	10 ± 5
hEPO + IL-3	17 ± 1
hEPO + hSCF	86 ± 10
hSCF	0

Další aktivitou rekombinantního lidského SCF je schopnost vyvolávat proliferaci lidské akutní myelogenové leukemické (AML) buněčné linie, KG-1 (ATCC CCL 246) v měkkém agaru. COS-1 supernatanty z transfektovaných buněk byly testovány v KG-1 agarové klonovací zkoušce (Koeffler a spol., Science, 200, 1153-1154 (1978)) v podstatě tak, jak je popsáno výše s výjimkou, že buňky byly umístěny na plotnu v koncentraci 3000/ml. Údaje ze tří kultur jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14

Zkouška klonování KG-1 na měkkém agaru

Transfektovaný plasmid	zkoušený objem (μ l)	kolonie poč./3000 buněk+SD (stand.odch.)
V19.8 (bez inzertu)	25	2 $\pm$ 1
V19.8 lidský SCF ¹⁻¹⁶²	25	14 $\pm$ 0
	12	8 $\pm$ 0
	6	9 $\pm$ 5
	3	6 $\pm$ 4
	1,5	6 $\pm$ 6
V19.8 krysí SCF ¹⁻¹⁶²	25	6 $\pm$ 1
lidský GM-CSF	50 (5 ng/1)	14 $\pm$ 5

Příklad 10

Čištění rekombinantních SCF produktů exprimovaných v E.coli

Fermentace E.coli lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ byla provedena podle příkladu 6C. Získané buňky (912 g vlhké hmotnosti) byly suspendovány ve vodě v objemu 4,6 l celkem a ponechány rozrušit trojím průchodem laboratorním homogenizátorem (Gaulin Model 15MR-8TBA) při 8000 psi. Pelety rozrušených buněk byly získány odstředěním (17700 x g, 30 min, 4 °C), promyty jednou vodou (resuspendovány a centrifugovány) a nakonec suspendovány ve vodě na objem 400 ml.

Frakce pelet, obsahujících nerozpustný SCF (přibližně 10 až 12 g SCF) byla přidána do 3950 ml vhodné směsi tak, že konečná koncentrace složek ve směsi byla 8 M močoviny (oltračisté), 0,1 mM EDTA, 50 mM octanu sodného, pH 6-7; SCF koncentrace byla hodnocena jako 1,5 mg/ml. Inkubace byla prováděna při teplotě místnosti po 4 hodiny pro rozpuštění SCF. Zbylý nerozpustný materiál byl odstraněn odstředěním (17700 x g, 30 min, teplota místnosti. Pro složení/reoxidaci rozpuštěného SCF, byly supernatantní frakce pomalu přidány za míchání, do 39,15 l vhodné směsi, takže konečné koncentrace složek ve směsi byly 2,5M močoviny (ultračisté), 0,01 mM EDTA, 5 mm octan sodný, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM glutathion, 0,02 % (hmotn./obj.) azid sodný. SCF koncentrace byla hodnocena jako 150 µg/ml. Po 60 h při teplotě místnosti (kratší doba (např. 20 h) je také vhodná), byla směs zahuštěna dvojnásobným průchodem ultrafiltračním zařízením Millipore FEllicon s polysulfonovými membránovými kazetami pro dělení mol. hmotnosti 10000 (tři kazety) (15 ft² celkový povrch) a pak diafiltrovány proti 7 objemům 20 mM Tris-HCl, pH

8. Teplota během koncentrace /ultrafiltrace byla 4 °C, rychlost čerpání 5 l/min a rychlost filtrace 600 ml/min. Konečný objem získaného retentátu byl 26,5 l. Použitím SDS-PAGE provedeným jak s tak bez redukce vzorků, je zřejmé, že nejvýše (> 80 %) pelet frakcí SCF je solubilizováno inkubací s 8 M močoviny a po složení (oxidaci jsou přítomny násobné druhy (formy) SCF, jak je zřejmé z SDS-PAGE neredukovaných vzorků. Hlavní forma, která představuje správně oxidovaný SCF (viz níže), migruje se zjevnou M_r asi 17000 (neredukovaná) vzhledem k markerům molekulové hmotnosti (redukované) popsáním na obr. 9. Další formy obsahují materiál, migrující se zjevnou M_r asi 18–20000 (neredukováno), předpokládá se, že představují SCF s nesprávnými disulfidovými vazbami uvnitř řetězce a próby, migrující se zjevnými M_r v rozmezí 37000 (neredukováno) nebo větší, o čemž se předpokládá, že představuje různé SCF formy, mající vnitřní disulfidové vazby vzniklé v SCF polypeptidových řetězcích, které jsou kovalentně navázány za vzniku dimerů nebo dlouhých oligomerů. Následující stupně frakcionace spočívají v odstranění zbývajících E.coli kontaminantů a neočekávaných SCF forem, takže se získá SCF čištěný do zjevné homogenity v biologicky aktivní konformaci.

pH ultrafiltračního retentátu bylo upraveno na 4,5 přidávkem 375 ml 10% (obj./obj.) kyseliny octové, což vede k vysrážení materiálu. Po 60 minutách, to jest době, kdy se usadí na dně nádoby nejvíce materiálu, se horních 24 l dekantuje a zfiltruje přes Cuno™ 30SP tlustý filtr při 500 ml/min pro úplné vyjasnění roztoku. Filtrát se pak zředí 1,5krát vodou a aplikuje při 4 °C na kolonu S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) (9 x 18,5 cm) ekvilibrovanou ve 25 mM octanu sodném, pH 4,5. Kolonou materiál protékal rychlostí 5 l/h při

4 °C. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta pěti objemy kolony (6 l) kolonového pufru a SCF materiál, který je vázán na kolonu, byl eluován gradientem od 0 do 0,35 M NaCl kolonovým pufrem. Celkový objem gradientu byl 20 l a byly odebírány frakce 200 ml. Eluční profil je znázorněn na obr. 33. Podíly (10 μ l) z frakcí odebíraných ze S-Sepharosové kolony, byly analyzovány SDS-PAGE provedené jak s (obr. 32A) tak bez (obr. 32B) redukce vzorku. Z těchto analýz je zřejmé, že pravděpodobně všechny absorbance při 280 nm (obr. 32 a 33) jsou způsobeny SCF materiálem.

Správně oxidovaná forma převládá v píku hlavní absorbance (frakce 22-38, obr. 33). Menší druhy (formy), které mohou být vizualizovány ve frakcích, zahrnují nesprávně oxidovaný materiál se zjevnou M_r 18-20000 na SDS-PAGE (neredukovaná), přítomný ve vzestupném ramenu hlavního absorbančního píku (frakce 10-21, obr. 32B); a disulfidový vázaný dimerní materiál, přítomný ve vzestupném ramenu hlavního absorbančního píku (frakce 10-21, obr. 32B); a disulfidový vázaný dimerní materiál, přítomný v oblasti absorbance (frakce 10-38, obr. 32B).

Frakce 22-38 se S-Sepharosové kolony byly spojeny a tento pool byl upraven na pH 2,2 přidáním asi 11 ml 6N HCl a aplikován na Vydac C₄ kolonu (výška 8,4 cm, průměr 9 cm) ekvilibrovanou s 50% (obj./obj.) ethanolem, 12,5 mM HCl (roztok A) a operace byla prováděna při 4 °C. Pryskeřice kolony byla připravena suspendováním suché pryskeřice v 80% (obj./obj.) ethanolu, 12,5 mM HCl (roztok B) a pak ekvilibrováním v roztoku A. Před aplikací vzorku byl aplikován slepý gradient od roztoku A k roztoku B (6 l celkového objemu) a kolona byla pak reekvilibrována roztokem A. Po aplikaci

vzorku byla kolona promyta 2,5 l roztoku A a SCF materiál vázaný na kolonu byl eluován gradientem od roztoku A do roztoku B (18 l celkový objem) při rychlosti průtoku 2670 ml/h. Bylo odebráno 286 frakcí po 50 ml a podíly byly analyzovány absorbancí při 280 nm (obr. 35) a SDS-PAGE (25 μ l na frakci) jak je popsáno výše (obr.34A, redukční podmínky, obr. 34B neredukční podmínky). Frakce 62-161, obsahující správně oxidovaný SCF ve vysoce čistém stavu, byly spojeny (relativně malé množství nesprávně oxidovaného monomeru s M_r asi 18-20000 (neredukováno) eluovaným později v gradientu (asi frakce 166 až 211) a disulfidový dimerový materiál byl také eluován později (asi frakce 199 až 235)(obr.35).

Pro odstranění ethanolu z poolu frakcí 62 až 161 a pro zahuštění SCF byl použit následující postup, využívající Q-Sepharosovou Fast Flow (Pharmacie) iontovýmennou pryskyřici. Pool (5 l) byl zředěn vodou na objem 16,625 l, na koncentraci ethanolu asi 20 % (obj./obj.). Pak byla přidána 1 M Tris báze (135 ml) pro upravení pH na hodnotu 8, dále 1 M Tris-HCl, pH 8 (23,6 ml) pro upravení celkové Tris koncentrace na 10 mM. Dalších 10 mM Tris-HCl, pH 8 (asi 15,5 l) bylo přidáno na celkový objem asi 10 % (obj./obj.). Materiál byl pak aplikován při 4 °C na kolonu Q-Sepharose Fast Flow (výška 6,5 cm, průměr 7 cm), ekvilibrovanou 10 mM Tris-HCl a pak následovalo promývání kolony 2,5 l kolonového pufu. Rychlost průtoku vzorku při aplikaci a promývání byla asi 5,5 l/h. Pro eluci vázaného SCF bylo čerpáno 200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8 v opačném směru kolonou rychlostí asi 200 ml/h. Frakce asi 12 ml byly odebrány a analyzovány absorbancí při 280 nm a SDS-PAGE jak je uvedeno výše. Frakce 16-28 byly spojeny (157 ml).

Pool, obsahující SCF, byl pak aplikován ve dvou oddělených chromatografických pokusech (78,5 ml použito v každém) na Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) kolonu pro gelovou filtraci (5 x 138 cm) ekvilibrovanou fosfátem pufovaným salinickým roztokem při 4 °C. Frakce asi 15 ml byly odebrány při průtokové rychlosti asi 75 ml/h. V každém případě hlavní pík materiálu s absorbcí při 280 nm eluovaný ve frakcích odpovídá zhruba elučnímu objemu v rozmezí od 1370 do 1635 ml. Frakce, představující absorpční píky ze dvou kolonových pokusů, byly spojeny do ojemů 525 ml, obsahujícího asi 2,3 SCF. Tento materiál byl sterilizován filtrací za použití zařízení Millipore Millipak 20 membránová vložka.

Alternativně, materiál z kolony C₄ může být koncentrován ultrafiltrací a pufr vyměněn diafiltrací, před sterilní filtrací.

Izolovaný rekombinantní lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ materiál je vysoce čistý (>98 % podle SDS-PAGE s vyvoláním stříbrem) a je pokládán za farmaceuticky čistý. Za použití metod z příkladu 2 je zjištěno, že materiál má aminokyselinové složení, odpovídající analýze SCF genu a má N-koncovou aminokyselinovou sekvenci Met-Glu-Gly-Ile..., podle očekávání, s udržení Met kodovaného iniciačním kodonem.

Podobnými postupy uvedenými pro lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ exprimovaný v E.coli, může být také získán kysí SCF¹⁻¹⁶⁴ (také přítomný v nerozpustné formě uvnitř buňky po fermentaci) v čistém stavu s vysokou biologickou specifickou aktivitou. Stejně může být získán lidský SCF¹⁻¹⁸³ a kysí SCF¹⁻¹⁹³. Kysí SCF¹⁻¹⁹³ během skládání/oxidace jeví sklon ke tvorbě různých oxidovaných druhů a je nesnadnější odstranit tyto neočekávané

druhy chromatograficky.

Krysí SCF¹⁻¹⁹³ a lidský SCF¹⁻¹⁸³ jsou náchylné k proteolytické degradaci během počátečních stupňů získávání, tj. solubilizace a skládání/oxidace. Primární místo proteolýzy je umístěno mezi zbytky 160 a 170. Proteolýza může být minimalizována vhodnou úpravou podmínek (např. koncentrace SCF, změnou pH, přidáním EDTA na 2⁷/₅ mM, nebo jinými inhibitory proteázy) a očekávané degradované formy mohou být odstraněny vhodnými dělicími stupni.

Zatímco použití močoviny pro solubilizaci a během skládání/oxidace, jak je uvedeno, je výhodným provedením, mohou být použita i další solubilizační činidla jako je guanidin.HCl (např. 6 M během solubilizace a 1,25 M během skládání/oxidace) a N-lauroylsarkosin sodný. Po odstranění činidel po skládání/oxidaci, může být získán vyčištěný SCF jak je stanoveno SDS-PAGE, použitím vhodných dělicích stupňů.

Dále je výhodným provedením použití glutathionu v koncentraci 1 mM během skládání/oxidace, mohou být ovšem použity další podmínky se stejným nebo blízkým účinkem. Tyto například zahrnují použití místo 1 mM glutathionu 2 mM glutathionu plus 0,2 mM oxidovaného glutathionu, nebo 4 mM glutathionu plus 0,4 mM oxidovaného glutathionu nebo 1 mM 2-merkapt ethanolu nebo jiného thiolu.

Mimo chromatografických popsaných postupů jsou vhodné i jiné postupy pro získání SCF ve vyčištěné aktivní formě, které zahrnují hydrofobní interakční chromatografii (např. použití fenyl-~~SE~~₂pharosy (Pharmacia), používající vzorek v neutrálním pH za přítomnosti 1,7M síranu amonného a eluci gradientem

snižující se koncentrace síranu amonného); afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (např. použití chelatové-SEpharose (Pharmacia) s Cu^{2+} ionty, aplikace vzorku při téměř neutrálním pH za přítomnosti 1 mM imidazolu s elucí gradientem zvyšující se koncentrace imidazolu; hydroxylapatitové chromatografie (aplikace vzorku při neutrálním pH za přítomnosti 1 mM fosfátu a elucí zvyšujícím se gradientem fosfátu) a dalšími postupy, které jsou zřejmé odborníkům.

Další formy lidského SCF, odpovídající celému nebo části otevřeného čtecího rámečku, kódujícího aminokyseliny 1-248 na obr. 42, nebo odpovídající otevřenému čtecímu rámečku, kódovanému alternativně spojovanými mRNA, který může existovat (jak je reprezentován cDNA sekvencí na obr. 44) mohou být také exprimovány v *E. coli* a získány v čištěné formě postupy stejnými jak jsou výše popsány v tomto příkladu, s dalšími postupy, které jsou zřejmé pro odborníky.

Čištění a příprava forem, zahrnujících tak zvanou transmembránovou oblast, uvedené v příkladu 16 mohou využívat detergenty, zahrnující neionogenní detergenty a lipidy, zahrnující fosfolipidy, obsahující liposomovou strukturu.

Příklad 11

Rekombinantní SCF ze savčích buněk

A. Fermentace CHO buněk, produkujících SCF

Rekombinantní buňky ovary čínského křečka (CHO) (kmen CHO pDSR α 2 hSCF¹⁻¹⁶²) byly kultivovány na mikronosičích ve

20litrovém perfuzním kultivačním systému pro produkci lidského SCF¹-162. Fermentorový systém byl podobný systému použitému při kultivaci BRL 3A buněk, příklad 1B, s výjimkou následujících podmínek: kultivačním médiem použitým pro kultivaci CHO buněk byla směs media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMFM) a Ham's F-12 živná směs v poměru 1:1 (GIBCO), doplněné 2 mM glutaminu, neesenciálními aminokyselinami (ke zdvojnásobení existující koncentrace za použití 1:100 zředění Gibco č. 320-1140) a 5% fetálního bovinního séra. Získané medium bylo identické s výjimkou vynechání séra. Reaktor byl inokulován $5,6 \times 10^9$ CHO buňkami kultivovanými ve dvou 3-litrových nádobách. Buňky byly ponechány růst do koncentrace 4×10^5 buněk/ml. V tomto bodě bylo do reaktoru přidáno 100 gramů pre-sterilizovaného mikronosiče cytodex-2 (Pharmacia) jako suspenze ve 3 litrech fosfátem pufovaného salinického roztoku. Buňky byly ponechány napojit a růst na mikronosičích po dobu čtyř dnů. Růstové medium bylo perfundováno reaktorem podle potřeby vzhledem ke spotřebě glukózy. Koncentrace glukózy byla udržována přibližně na 2,0 g/l. Po čtyřech dnech byl reaktor perfundován šesti objemy sera-prostého media pro odstranění většiny séra (koncentrace proteinu $< 50 \mu\text{g/ml}$). Reaktor byl pak provozován vsádkově, dokud koncentrace glukózy neklesla pod 2 g/l. Od tohoto momentu byl reaktor provozován s kontinuální perfúzní rychlostí asi 20 l/den. pH kultury bylo udržováno na $6,9 \pm 0,3$ úpravou průtoku CO_2 . Rozpuštěný kyslík byl udržován na hladině vyšší než 20 % sycení vzduchem a podle potřeby doplňováním čistým kyslíkem. Teplota byla udržována na $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Z výše uvedeného systému bylo získáno přibližně 450 litrů kondicionovaného média a toto bylo použito jako výchozí materiál pro čištění rekombinantního lidského SCF¹-162.

Přibližně 569 litrů séra prostého kondicionovaného media bylo také získáno stejným postupem, ale za použití kmene CHO pDSRα2 rSCH¹⁻¹⁶² bylo použito jako výchozí materiál pro čištění krysího SCF¹⁻¹⁶².

B. Čištění rekombinantního savčího exprimovaného krysího SCF¹⁻¹⁶²

Všechny čistící postupy byly prováděny při 4 °C pokud není uvedeno jinak.

1. Koncentrace a diafiltrace

Kondicionované médium získané ze séra prosté kultivace buněčného kmene CHO pDSRα2 krysího SCF¹⁻¹⁶² jak je popsáno v sekci A výše, bylo vyčiřeno filtrací přes 0,45 μm Sartocapsules (Sartorius). Několik rozdílných vsádek (36 l, 101 l, 102 l, 200 l a 150 l) bylo odděleně zahuštěno a provedena výměna diafiltrace/pufr. Pro ilustraci - zpracování 36 l vsádky bylo následující. Filtrované kondicionované medium bylo zahuštěno na 500 ml za použití ultrafiltračního zařízení s tangenciálním průtokem Millipore Pellicon s membránovými kazetami z acetátu celulózy (tři kazety) oddělujícími molekulovou hmotnost 10000 (15 ft² celková plocha membrány, rychlost čerpání asi 2200 ml/min a rychlost filtrace asi 750 ml/min). Výměna diafiltrace/pufr pro aniontovýmennou chromatografii byla pak provedena přidáním 1000 ml 10 mM Tris-Hcl, pH 6,7-6,8 ke koncentrátu, znovuzahuštěním na 500 ml za použití zařízení pro ultrafiltraci s tangenciálním průtokem a opakováním tohoto přidávání 5krát.

Koncentrovaný/diafiltrovaný přípravek byl nakonec získán v objemu 1000 ml. Postup pro všechny vsádky kondicionovaného

media podrobené zahuštění a diafiltraci/výměně pufru byl stejný. Koncentrace proteinu ve vsádkách, stanovené metodou podle Bradforda (Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)) s hovězím sérovým albuminem jako standardem, byly v rozmezí 70 až 90 $\mu\text{g/ml}$. Celkový objem kondicionovaného media použitého pro tuto přípravu byl asi 589 l.

2. Aniontovýměnná chromatografie na Q-Sepharose s rychlým průtokem

Koncentrované/diafiltrované přípravky z každé z pěti vsádek kondicionovaného media uvedené výše byly spojeny (celkový objem 5000 ml). pH bylo upraveno na 6,75 přidáním 1 M HCl , 2000 ml 10 mM Tris-HCl, pH 6,7 bylo použito pro úpravu vodivosti na asi 0,700 mohm . Přípravek byl aplikován na aniontovýměnnou kolonu Q-Sepharosy s rychlým průtokem (36 x 14 cm, pryskyřice Q-Sepharose Fast Flow Pharmacia), která byla ekvilibrována s 10 mM Tris-HCl, pH 6,7 pufr. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 28700 ml Tris pufru. Po tomto promývání byla kolona promyta 2300 ml 5 mM octové kyseliny/1 mM glycin/6M močovina/20 μM CuSO_4 s pH asi 4,5. Kolona byla pak promyta 10 m Tris-HCl, 20 μM CuSO_4 , pH 6,7, pufru pro obnovení neutrálního pH a odstranění močoviny a solným gradientem (0-700 mM NaCl, v 10 mM Tris-HCl, 20 μM CuSO_4 , pH 6,7 pufr; 40 l objem celkem). Byly odebírány frakce velikosti asi 490 ml při průtokové rychlosti 3250 ml/h. Chromatogram je uveden na obr. 36. "MC/9 cpm" udává biologickou aktivitu v MC/9 zkoušce; 5 μl z každé označené frakce bylo zkoušeno. Eluáty odenrané během aplikace vzorku a promývané, nejsou na obrázku uvedeny, v těchto frakcích nebyla detekována žádná biologická aktivita.

3. Chromatografie za použití na silikagelu vázané uhlovodíkové pryskyřice

Frakce 44-66 z pokusu uvedeného na obr. 36 byly spojeny (11200 ml) a byla přidána EDTA do konečné koncentrace 1 mM. Tento materiál byl aplikován průtokovou rychlostí asi 2000 ml/h na C₄ kolonu (Vydac Proteins C₄, 7 x 8 cm) ekvilibrovanou pufrem A (10 mM Tris pH 6,7/20 % ethanolu). Po aplikaci vzorku na kolonu byla kolona promyta 1000 ml pufru A. Pak byl aplikován lineární gradient od pufru A do pufru B (10 mM Tris pH 6,7/94 % ethanolu) (celkový objem 6000 ml) a byly odebrány frakce 30 až 50 ml. Podíly ze startu vzorků na koloně C₄, souhrnného poolu a promývacího poolu přidané k 0,5 ml podílům gradientových frakcí byly dialyzovány proti fosfátem pufrovanému salinickému roztoku při přípravě pro biologickou zkoušku. Tyto různé frakce byly zkoušeny v MC/9 zkoušce (5 μ l podíly připravených gradientových frakcí; cpm na obr. 37). SDS-PAGE (Laemli, Nature 227, 680-685 (1970); zásobní gely obsahují 4 % (hmotn./obj.) akrylamidu a separační gely obsahují 12,5 % (hmotn./obj.) akrylamidu) podílů různých frakcí, je uvedena na obr. 38. Pro použití na gelu byly vzorky podílů (100 μ l) sušeny za vakua a pak znovu rozpuštěny za použití 20 μ l pufru pro zpracování vzorku (redukční, tj. se 2-merkapttoethanolem) a vařeny 5 min před vložením na gel. Číslované značky na levé straně obrázku představují migrační polohy markerů molekulové hmotnosti (redukované) jako na obr. 6. Číslované dráhy představují odpovídající frakce, odebrané během aplikace poslední části gradientu. Gely byly vyvolány stříbrem (Morrissey, Anal.Bioch. 117, 307-310 (1981)).

4. Aniontovýměnná chromatografie na Q-Sepharose s rychlým průtokem

Frakce 98-124 z C₄ kolony jsou uvedeny na obr. 37, tyto byly spojeny (1050 ml). Pool byl zředěn 1:1 mM Tris, pH 6,7 pufrem pro snížení koncentrace ethanolu. Zředěný pool byl pak aplikován na aniontovýměnnou Q-Sepharosovou kolonu s rychlým průtokem (3,2 x 3 cm, pryskyřice Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow), která byla ekvilibrována 10 mM Tris-HCl, pH 6,7 pufrem. Rychlost průtoku byla 463 ml/h. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 135 ml kolonového pufru a eluce navázaného materiálu byla provedena promytím 10 mM Tris-HCl, 350 mM NaCl, pH 6,7. Směs průtoku kolonou byl obrácen, aby se minimalizoval objem eluovaného materiálu a byly během eluce odebírány frakce 7,8 ml.

5. Sephacryl S-200 HR gelová filtrační chromatografie

Frakce, obsahující eluovaný protein z promývání aniontové Q-Sepharose Fast Flow kolony byly spojeny (31 ml). 30 ml bylo aplikováno na gelovou filtrační kolonu Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) (5 x 55,5 cm) ekvilibrovanou ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku. Frakce 6,8 ml byly odebrány při průtokové rychlosti 68 ml/h. Frakce, odpovídající píku absorbance při 280 nm byly spojeny a představují finální vyčištěný materiál.

Tabulka 15 představuje souhrn čištění.

Tabulka 15

Souhrnný přehled čištění savčího exprimovaného krysího SCF¹⁻¹⁶²

Stupeň	celkem	
	objem(ml)	protein(mg) *
kondicionované medium		
(koncentrované)	7000	28420
Q-Sepharose Fast Flow	11200	974
C ₄ pryskyřice	1050	19
Q-Sepharose Fast Flow	31	20
Sephacryl S-200 HR	82	19**

*Stanoveno metodou podle Bradforda (výše, 1976)

**Stanoveno jako 47,3 mg kvantitativní aminokyselinovou analýzou za použití metody stejné jak je uvedena v příkladu 2.

N-koncová aminokyselinová sekvence čištěného krysího SCF¹⁻¹⁶² je přibližně polovina Gln-Glu-Ile... a polovina PyroGlu-Glu-Ile..., jak bylo stanoveno metodami podle příkladu 2. Tyto výsledky prokazují, že krysí SCF¹⁻¹⁶² je produktem proteolytických štěpení mezi zbytky označovanými jako čísla (-1)(Thr) a (+1)(Gln) na obr. 14C. Podobně čištěný lidský SCF¹⁻¹⁶² z kondicionovaného media transfektovaných CHO buněk (níže) měl N-koncovou aminokyselinovou sekvenci Glu-Gly-Ile, indikující, že je produktem štěpení mezi zbytky označenými jako čísla (-1)(Thr) a (+1)(Glu) na obr. 15C.

Za použití výše uvedeného postupu byl získán čištěný lidský SCF protein, buď rekombinantně vytvořený expresí v CHO buňkách nebo přirozeně získaný.

Další čistící metody, které jsou vhodné pro čištění ze savčích buněk získaného rekombinantního SCF zahrnují postupy uvedené v příkladu 1 a 10 a další metody zřejmě odborníkům.

Další formy lidského SCF, odpovídající celému nebo části otevřeného rámečku, kodujícího aminokyseliny 1-248 uvedené na obr. 42 nebo odpovídající otevřenému čtecímu rámečku kodujícímu alternativně spojené mRNA, které mohou existovat (jako CDNA sekvence na obr. 44), mohou být také exprimovány v savčích buňkách a získány v čištěné formě postupy podobnými postupům popsaným v tomto příkladu a dalšími postupy zřejmými odborníkům.

C. SDS-PAGE a zpracování glykosidázou

SDS-PAGE spojených frakcí z gelové filtrační kolony Sephacryl S-200 HR je uvedeno na obr. 39. 2,5 μ l spojené frakce bylo vloženo na gel (dráha 1). Dráha byla vyvolána stříbrem. Markery molekulové hmotnosti jsou uvedeny na obr. 6 (dráha 6). Různý materiál migrující po a nad M_r 31000 polohou markeru představuje biologicky aktivní materiál; zřejmě heterogenita je do značné míry způsobena heterogenitou při glykosylaci.

Pro charakterizování glykosylace byl čištěný materiál zpracován s různými glykosidázami, analyzován SDS-PAGE (redukční podmínky) a byl vizualizován postříbřením. Výsledky jsou uvedeny na obr. 39. Dráha 2 - neuraminidáza. Dráha 3 - neuraminidáza a O-glykanáza. Dráha 4 - neuraminidáza, O-glykanáza a N-glykanáza. Dráha 5 - neuraminidáza a N-glykanáza. Dráha 7 - N-glykanáza. Dráha 9 - N-glykanáza bez substrátu. Dráha 9 - O-glykanáza bez substrátu. Podmínky byly

10 mM 3-/(3-cholamidopropyl)dimethylamonio/-1-propensulfonát (CHAPS), 66,6 mM 2-merkapt ethanol, 0,04 % (hmotn./obj.) azid sodný, fosfátem pufrovaný salinický roztok, 30 minut při 37 °C, s následující inkubací při polovině uvedených koncentrací za přítomnosti glykosidáz po 18 h při 37 °C. Neuraminidáza (z *Arthrobacter ureafaciens*, dodaný Calbiochem) byla použita při konečné koncentraci 0,5 jednotky/ml. O-Glykanáza (Genzyme; endo-alfa-N-acetyl-galaktosaminidáza) byla použita v koncentraci 7,5 milijednotek/ml. N-Glykanáza (Genzyme; peptid:N-glykosidáza F; peptid-N⁴/N-acetyl-beta-glukosaminy) asparaginamidáza) byla použita v koncentraci 10 jednotek/ml.

Kde je to žádoucí, byly provedeny různé kontrolní inkubace. Tyto zahrnují: inkubaci bez glykosidáz, pro ověření, že výsledky jsou způsobeny přidanými přípravky glykosidázy; inkubace s glykosylovanými proteiny (např. glykosylovaný rekombinantní lidský erythropo~~o~~etin) známých jako substráty pro glykosylázy, pro ověření, že použité glykosidázové enzymy byly aktivní; a inkubace s glykosidázami, ale bez substrátu, pro posouzení, zda glykosidázové přípravky přispívají nebo zatemňují vizualizaci gelových pruhů (obr. 8 a 9).

Početné hodnocení je možno provést z výše uvedených pokusů. Různá zpracování s N-glykanázou (která odstraňuje jako komplex vysoce-mannosou N-vázaný karbohydrát (Tarentino a spol., *Biochemistry* 24, 4665-4671 (1988)), neuraminidázou (která odstraňuje zbytky sialové kyseliny) a O-glykanázou (která odstraňuje určité O-vázané karbohydráty (Lambin a spol., *Biochem. Soc. Trans.* 12, 599-600 (1984))), potvrzují, že: jsou přítomny jak N-vázaný tak O-vázaný karbohydrát; je přítomna sialová kyselinam kde alespoň její část tvoří

O-vázané skupiny. Skutečnost, že ošetření N-glykanázou může převést heterogenní materiál podle SDS-PAGE na rychleji migrující formu, která je mnohem více homogenní indikuje, že všechen materiál představuje stejný polypeptid, s heterogenitou, která je způsobena hlavně heterogenitou při glykosylaci.

Příklad 12

Příprava rekombinantního SCF¹⁻¹⁶⁴PEG

Krysí SCF¹⁻¹⁶⁴, čištěný z rekombinantního E.coli expresního systému podle příkladů 6A a 10, byl použit jako výchozí materiál pro modifikaci s polyethylenglykolem jak je popsáno dále.

Methoxypolyethylenglykol-sukcinimidylsukcinát (18,1 mg = 3,63 μ mol, SS-MPEG = Sigma Chemical Co. č. M3152, přibližná mol. hmotnost = 5000) v 0,327 ml deionizované vody byl přidán ke 13,3 mg (0,727 μ mol) rekombinantního krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ v 1,0 ml 138 mM fosforečnanu sodném, 62 mM NaCl, 0,62 mM octanu sodném, pH 8,0. Výsledný roztok byl šetrně třepán (100 ot/min) při teplotě místnosti po 30 minut. 1,0ml podíly konečné reakční směsi (10 mg proteinu) pak byly aplikovány na gelovou filtrační kolonu Pharmacia Superdex 75 (1,6 x 50 cm) a eluovány 100 mM fosfátem sodným, pH 6,9, při rychlosti 0,25 ml/min při teplotě místnosti. Prvních 10 ml z kolony bylo odloženo a pak byly odebírány 1,0ml frakce. Byla monitorována UV absorbance při ²⁸⁰nm u eluentu z kolony a tato absorbance je uvedena na obr. 40A. Frakce č. 25 až 27 byly spojeny a sterilizovány ultrafiltrací přes 0,2 μ m polysulfonovou membránu (Gelman Sciences č. 4454) a výsledný pool byl označen

PEG-25. Podobně byly frakce č. 28 až 32 spojeny, sterilizovány ultrafiltrací a označeny jako PEG-25. Spojené frakce ~~peg-25~~^{PEG-25} obsahují 3,06 mg proteinu a spojené frakce PEG-32 obsahují 3,55 mg proteinu jak je vypočteno z měření A280 za použití kalibrace dané absorbancí roztoku 1,0 ml/ml nemodifikovaného krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ při 0,66. Nezreagovaný kryší SCF¹⁻¹⁶⁴, představující 11,8 % celkového proteinu v reakční směsi, byl eluován ve frakcích číslo 34 až 37. Za stejných chromatografických podmínek byl nemodifikovaný kryší SCF¹⁻¹⁶⁴ eluován jako hlavní pík s retenčním objemem 45,6 ml, obr. 40B. Frakce č. 77 až 80 na obr. 40A, obsahují N-hydroxysukcinimid, vedlejší produkt reakce krysího SCF¹⁻¹⁶⁴PEG se SS-MPEG.

Potenciálně reaktivní ^γaminoskupiny v kryším SCF¹⁻¹⁶⁴ zahrnují 12 lysinových zbytků a alfa-aminoskupinu na N-konci glutaminového zbytku. Poolované frakce PEG-25 obsahují 9,3 mol reaktivních aminoskupin na mol proteinu, stanoveno spektroskopickou titrací trinitrobenzensulfonovou kyselinou (TNBS) za použití metody popsané Habeebem, Anal.Biochem., 14:328-336 (1966). Podobně spojené frakce PEG-32 obsahují 10,4 mol a nemodifikovaný kryší SCF¹⁻¹⁶⁴ obsahuje 13,7 mol reaktivních aminoskupin na mol proteinu. Průměrně 3,3 (13,7 mínus 10,4) aminoskupin krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ ve spojené frakci PEG-32 bylo modifikováno reakcí s SS-MPEG. Podobně průměrně 4,4 aminoskupiny krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ ve spojené frakci PEG-25 byly modifikovány. Lidský SCF (hSCF¹⁻¹⁶⁴) produkovaný jako v příkladu 10 byl také modifikován postupem uvedeným výše. Specificky, 714 mg (38,5 μmol) hSCF¹⁻¹⁶⁴ reagovalo s 962,5 mg (192,5 μmol) SS-MPEG v 75 ml 0,1M pufru-fosforečnanu sodného, pH 8,0 po 30 minut při teplotě místnosti. Reakční směs byla aplikována na kolonu Sephacrylu S-200HR (5 x 134 cm) a eluována PES (Gibco Dulbecco fosfátem pufrovaný salinický

roztok bez CaCl_2 a MgCl_2) rychlostí 102 ml/h, a byly odebírány frakce 14,3 ml. Frakce č. 39-53 analogické PEG-25 poolu popsanému výše a na obr. 40A, byly spojeny a bylo zjištěno, že obsahují celkem 354 mg proteinu. Aktivita in vivo takto modifikovaného SCF u primátů je popsána v příkladu 8C.

Příklad 13

Exprese receptoru SCF na leukemických blastech

Leukoblasty byly získány z periferní krve pacienta se smíšenou leukemií. Buňky byly čištěny odstředováním gradientovou hustotou a potlačením adheze. Lidský SCF^{1-164} byl jodován podle popisu uvedeného v příkladu 7. Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi jodovaného SCF jak bylo popsáno (Broudy, 75 1622-1626 (1990)). Výsledky pokusu vazby receptoru jsou uvedeny na obr. 41. Hustota receptoru je přibližně 70000 receptorů/buňka.

Příklad 14

Aktivita krysího SCF na ranných lymfoidních prekurzorech

Schopnost rekombinantního krysího SCF^{1-164} (rrSCF^{1-164}), působit synergicky s IL-7 pro zvýšení proliferace lymfoidních buněk byla studována na agarových kulturách myší kostní dřeně. V této zkoušce kolonie vytvořené se samotným rrSCF^{1-164} obsahují monocyty, neurofily a blastové buňky, zatímco kolonie stimulované samotným IL-7 nebo v kombinaci s rrSCF^{1-164} obsahují převážně pre-B buňky. Pre-B buňky charakterizované jako B220^+ , sIg^- , $\text{c}\mu^+$, byly identifikovány FACS analýzou spojených buněk za použití fluorescenčně značených protilátek

k B220 antigenu (Coffman Immunol.Rev., 69, 5 (1982)) a k povrchovému Ig (FITC-koží anti-K, Southern Biotechnology Assoc., Birmingham, AL) a analýzou cytospinových sklíček pro cytoplasmickou μ expresi za použití fluorescenčně značených protilátek (TRITC-koží anti μ , Southern Biotechnology Assoc.). Rekombinantní lidský IL-7 (rhIL-7) byl získán od Biosource International (Westlake Village, CA). Když byl přidán rrSCF¹⁻¹⁶⁴ v kombinaci s pre-B faktorem růstu buněk IL-7, bylo pozorováno synergické zvýšení tvorby kolonií (tabulka 16), indikující stimulující roli rrSCF¹⁻¹⁶⁴ na časných B buněčných progenitorech.

Tabulka 16

Stimulace tvorby kolonií Pre-B buněk pomocí rrSCF¹⁻¹⁶⁴ v kombinaci s hIL-7

Růstové faktory		počet kolonií ¹
salinický roztok		0
rrSCF ¹⁻¹⁶⁴	200 ng	13 $\pm$ 2
	100 ng	7 $\pm$ 4
	50 ng	4 $\pm$ 2
rhIL-7	200 ng	21 $\pm$ 6
	100 ng	18 $\pm$ 6
	50 ng	13 $\pm$ 6
	25 ng	4 $\pm$ 2
rhIL-7	200 ng + rrSCF ¹⁻¹⁶⁴ 200 ng	60 $\pm$ 0
	100 ng + 200 ng	48 $\pm$ 8
	50 ng + 200 ng	24 $\pm$ 10
	25 ng + 200 ng	21 $\pm$ 2

¹Počet kolonií na 5×10^4 buněk myší kostní dřeně, které byly umístěny na plotnu.

Každá hodnota je průměr ze tří ploten $\pm$ stand. odchylka.

Příklad 15

Identifikace receptoru pro SCF

A. c-kit je receptorem pro SCF¹⁻¹⁶⁴

Pro testování, zda SCF¹⁻¹⁶⁴ je ligandem pro c-kit, byla cDNA pro celý myší c-kit (Qiu a spol., EMBO J., 7, 1003-1011 (1988)) amplifikována za použití PCR z SCF¹⁻¹⁶⁴ citlivá mast cell linie M3/9 (Nabel a spol., Nature, 291, 332-334 (1981)) s primery podle publikované sekvence. Ligand vazby a transmembránové domény lidského c-kitu, kodovaného aminokyselinami 1-549 (Yarden a spol., EMBO J., 6, 3341-3351 (1987)), byly klonovány za použití stejných technik z lidské erythroleukemické buněčné linie, HEL (Martin a Papayannopoulou, Science, 216, 1233-1235 (1982)). cDNA c-kitu byly inzertovány do savčího expresního vektoru V19.8 transfektovaného do COS-1 buněk a membránových frakcí připravených pro vazbovou zkoušku použitím buď krysího nebo lidského ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ podle metod popsanych v sekci B a C dále. Tabulka 17 představuje údaje z typické vazbové zkoušky. Nejsou zde specifické vazby ¹²⁵I lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ na COS_1 buňky transfektované samotným V19.8. Nicméně COS-1 buňky exprimující lidský rekombinantní c-kit ligandové vazby plus transmembránové domény (hckit-LTL) vázaly ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ (tabulka 17). Přídavek 200 násobku molárního přebytku neznačeného lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ snižuje vazbu na základní

úroveň. Podobně COS-1 buňky transfektované plnou délkou myšského c-kitu (monokit-L1) vážou krysí ^{125}I -SCF¹-164. Malé množství vazby krysího ^{125}I -SCF¹-164 bylo detegováno v COS-1 buňkách transfektovaných samotným V19.8 a bylo také pozorováno v netransfektovaných buňkách (neznázorněno), což indikuje, že COS-1 buňky exprimují endogenní c-kit. Toto zjištění je v souladu se širokou molekulární distribucí exprese c-kitu.

Krysí ^{125}I -SCF¹-164 se váže stejně jak k lidskému tak k myšskému c-kitu, zatímco lidský ^{125}I -SCF¹-164 se váže s nižší aktivitou k myšskému c-kitu (tabulka 17). Tyto údaje jsou v souladu s modelem křížové reaktivity SCF¹-164 mezi druhy. Krysí SCF¹-164 indukuje proliferaci lidské kostní dřeně se specifickou aktivitou stejně jako lidský SCF¹-164, zatímco lidský SCF¹-164 indukuje proliferaci myšských mast buněk se specifickou aktivitou 800krát nižší než krysí protein.

Souhrnně jsou tyto údaje v souladu s tím, že fenotypové abnormality exprimované W nebo S1 mutantní myši jsou následkem primárních defektů v c-kitu interakcí receptor/ligand, které jsou kritické pro vývoj různých typů buněk.

Tabulka 17

SCF¹⁻¹⁶⁴ vazba k rekombinantnímu c-kitu exprimovanému v COS-1 buňkách

Transfektovaný plasmid	CPM vazba ^a			
	lidský SCF ¹⁻¹⁶⁴		kryší SCF ¹⁻¹⁶⁴	
	¹²⁵ I-SCF ^b	¹²⁵ I-SCF+nezn. ^c	¹²⁵ I-SCF ^d	¹²⁵ I-SCF+ nezn. ^e
V19.8	2,160	2,150	1,100	550
V19.8:hckit-LT1	59,350	2,380	70,000	1,100
V19.8 :mckit-L1	9500	1,100	52,700	600

^aJe uveden průměr ze dvou měření; pokus byl proveden nezávisle se stejnými výsledky třikrát.

^b1,6 nM lidský ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴

^c1,6 nM lidský ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ + 320 nM neznačený lidský SCF¹⁻¹⁶⁴

^d1,6 nM kryší ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴

^e1,6 nM kryší ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ + 320 nM neznačený kryší SCF¹⁻¹⁶⁴

B. Exprese rekombinantního c-kitu v COS-1 buňkách

Klony lidské a myší c-kitové cDNA byly získány použitím PCR techniky (Saiki a spol., Science, 239, 487-491 (1988)) z celkové RNA izolované postupem kyselé fenol/chloroformové extrakce (Chomczynsky a Sacchi, Anal.Biochem., 162, 156-159 (1987)) z lidské erythroleukemické buněčné linie HEL a MC/9 buněk. Unikátní sekvence oligonukleotidů byly navrženy z publikovaných lidských a myších C-kitových sekvencí. První řetězec cDNA byl syntetizován z celkové RNA podle protokolu získaného s enzymem, Mo-MLV reverzní transkripce (Bethesda

Research Laboratories, Bethesda, MD) za použití opačných c-kitových oligonukleotidů jako primerů. Amplifikace přesahujících oblastí c-kitové ligandové vazby a domén tyrosin kinázy byla provedena za použití vhodných párů c-kitových primerů. Tyto oblasti byly klonovány do savčího expresního vektoru V19.8 (obr. 17) pro expresi v COS-1 buňkách. DNA sekvenování některých klonů odhaluje nezávislé mutace převážně vzniklé během PCR amplifikace v každém klonu. Klon prostý těchto mutací byl konstruován znovusestavením mutací prostých restričních fragmentů ze separátních klonů. Určité odchylky od publikovaných sekvencí se objevily ve všech nebo v asi polovině klonů; tyto byly považovány za aktuální sekvence přítomné v použité buněčné linii a mohou představovat alelové difference publikovaných sekvencí. Ve V19.8 byly konstruovány následující plasmidy: V19.8 :mckit-LT1, celý myší c-kit; a V19.8:kckit-L1, obsahující ligandovou vazbu plus transmembránovou oblast (aminokyseliny 1-549) lidského c-kitu.

Plasmidy byly transfektovány do COS-1 buněk v podstatě jak je popsáno v příkladu 4.

C. ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴ vazba k COS-1 buňkám exprimujícím rekombinantní c-kit

Dva dny po transfekci byly COS-1 buňky seškrábnuty zisky, promyty v PBS a zmrazeny do použití. Po roztání byly buňky resuspendovány v 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂ obsahující 1 mM PMSF, 100 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin a 200 µg/ml TLCK-HCl. Suspenze byla dispergována nasátím a vypuštěním z pipety pětkrát, inkubována na ledu 15 minut a buňky byly homogenizovány 15-20 nárazy Dounce homogenizéru. Sacharóza (250 mM) byla přidána k homogenátu a

jaderná frakce a zbylé nerozrušené buňky byly peletovány odstředěním při 500 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstředěn při 25000 g po 30 minut při 4 °C pro peletování zbylých buněčných kusů. Lidský a krysí SCF¹⁻¹⁶⁴ byly označeny radioaktivním jodem za použití chloraminu-T /Hunter a Greenwood, Nature, 194, 495-496 (1962)/. COS-1 membránové frakce byly inkubovány buď s lidským nebo krysím ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ (1,6 nM) a nebo bez 200násobného přebytku neznačeného SCF¹⁻¹⁶⁴ ve vázacím pufru, obsahujícím RPMI doplněný 1 % hovězího serového albuminu a 50 mM HEPES (pH 7,4) po 1 hodinu při 22 °C. Při ukončení inkubace vazby, byly membránové přípravky šetrně rozvrstveny na 150 µl ftalátového oleje a odstředovány po 20 minut v Beckman Microfuge 11 pro oddělení membránově vázaného ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ od volného ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴. Pelety byly odděleny a membránově napojený ¹²⁵I-SCF¹⁻¹⁶⁴ byl kvantifikován.

Příklad 16

A. Izolace cDNA lidského SCF

Celková RNA byla izolována z lidské fibrosarkomové buněčné linie HT-1080 (ATCC CCL 121) metodou extrakce za pomoci směsi kyselý guanidiniumthiokyanát-fenol-chloroform (Chomczynski a spol., Anal.Biochem. 162, 156 (1987)) a poly(A) RNA byla získána za použití oligo(dT) kolony získané od Clontech. Dvojřetězcová cDNA byla připravena ze 2 µg poly(A) RNA s BRL (Bethesda Research Laboratory) cDNA syntézním kitem za podmínek doporučených dodavatelem. Přibližně 100 ng na koloně dělené dvojřetězcové cDNA s průměrnou velikostí 2kb bylo ligováno ke 300 ng SalI/NotI štěpeného vektoru pSPORT 1 /D'Alessio a spol., Focus, 12, 47-50(190)/ a transformovaného

do DH5 α (BRL, Bethesda, MD) buněk elektroporací (Dower a spol., Nucl.Acids Res., 16, 6127-6145 (1988)).

B. Screening cDNA knih^ovny

Přibližně $2,2 \times 10^5$ primárních transformantů bylo rozděleno do 44 poolů, každý o obsahu asi 5000 individuálních klonů. Plasmidová DNA byla připravena z každého poolu CTAB-DNA srážecí metodou jak je popsána (Del Sal a spol., Biotechniques, 7, 514-519 (1989)). Dva mikrogramy každého poolu plasmidové DNA byla štěpeny restriční enzymem NotI a odděleny gelovou elektroforézou. Linearizovaná DNA byla transferována na GeneScreen Plus membránu (DuPont) a hybridizována se ^{32}P -značenou PCR generovanou lidskou SCF cDNA (příklad 3) za podmínek popsaných dříve (Lin a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82, 7580-7584 (1985)). Tři pooly, obsahující pozitivní signál byly identifikovány z hybridizace. Tyto pooly kolonií byly rescreenovány hybridizačním koloniovým postupem (Lin a spol., Gene 44, 201-209 (1986)) až byla z každého poolu získána jedna kolonie. Velikost cDNA těchto tří izolovaných klonů byla mezi 5,0 až 5,4 kb. Štěpení restričními enzymy a stanovení nukleotidové sekvence na 5' konci indikují, že dva z těchto tří klonů jsou identické (10-1a a 21-7a). Oba obsahují kodující oblast a přibližně 200 bp 5' netranslatované oblasti (5'UTR). Třetí klon (26-1a) je zhruba o 400 bp kratší na 5' konci než druhé dva klony. Sekvence cDNA lidského SCF je uvedena na obr. 42. Zvláště podrobně zaznamenána je hydrofobní transmembránová doménová sekvence začínající v oblasti aminokyselin 186-190 a končící u aminokyseliny 212.

C. Konstrukce pDSR α 2 hSCF¹⁻²⁴⁸

pDSR α 2 hSCF¹⁻²⁴⁸ byl generován za použití plasmidů 10-1a (jak je popsáno v příkladu 168) a pGEM3 hSCF¹⁻¹⁶⁴ následovně: HindIII inzert z pGEM3 hSCF¹⁻¹⁶⁴ byl transferován do M13mp18. Nukleotidy bezprostředně v protisměru k ATG iniciačnímu kodonu byly vyměněny místně řízenou mutagenezí z tttccttATG na gccgccgccATG za použití opačného oligonukleotidu

5'-TCT TCT TCA TGG CGG CGG CAA GCT T 3'

a oligonukleotidem řízeným in vitro kitovým mutagenezním systémem a protokoly Amersham Corp. pro generování M13mp18 hSCF^{K1-164}. Tato DNA byla štěpena HindIII a inzertována do pDSR α 2, který byl štěpen HindIII. Tento klon je označen pDSR α 2 hSCF^{K1-164}. DNA z pDSR α 2 hSCF^{K1-164} byl štěpen XbaI a DNA byla opatřena typými konci přidáním Klenowova enzymu a čtyř dNTP. Po ukončení této reakce byla DNA štěpena enzymem SpeI. Klon 10-1a byl štěpen pomocí DraI pro vytvoření tupého konce 3' pro otevřený čtecí rámeček v inzertu a pomocí SpeI, který štěpí na stejném místě v genu jak v pDSR α 2 hSCF^{K1-164} tak 10-1a. Tyto DNA byly společně spojeny za vzniku pDSR α 2 hSCF^{K1-248}.

D. Transfekce a imunoprecipitace COS buněk s pDSR α 2 hSCF^{K1-248} DNA

COS-7 (ATCC CRL 1651) buňky byly transfektovány s DNA konstruovanou výše ppsaným způsobem. 4×10^6 buněk v 0,8 ml DMEM + 5 % PBS bylo elektroporováno při 1600 V buď 10 μ g pDSR α 2 hSCF^{K1-248} DNA nebo 10 μ g pDSR 2 vektorové DNA (vektorová kontrola). Po elektroporaci byly buňky umístěny do dvou 60mm misek. Po 24 hodinách bylo médium nahrazeno čerstvým

kompletním médiem.

72 hodin po transfekci byla každá miska označena ^{35}S -mediem podle modifikace protokolu Yardena a spol., (PNAS 87, 2569-2573, 1990). Buňky byly promyty jednou PBS a pak inkubovány s DMEM prostým methioninu, prostým cysteinu (met-cys-DMEM) po 30 minut. Médium bylo odstraněno a ke každé misce byl přidán 1 ml met-cys-DMEM, obsahující 100 $\mu\text{Ci/ml}$ Trans ^{35}S -značeného (ICN). Buňky byly inkubovány při 37 °C po 8 hodin. Médium bylo odebráno, vyčiřeno odstředěním, pro odstranění zlomků buněk a zmrazeno na -20 °C.

Podíly značeného kondicionovaného media z COS/pDSR α 2 hSCF κ 1-248 a COS/pDSR α 2 vektorové kontroly byly imunoprecipitovány spolu se vzorky média ze ^{35}S -značeného CHO/pDSR α 2 hSCF κ 1-164 klonu 17 buněk (viz příklad 5) v souladu s modifikací protokolu Yardena a spol. (EMBO J. 6, 3341-3351, 1987). Jeden ml každého vzorku kondicionovaného média byl zpracován s 10 μl pre-imunního králičího séra (č. 1379 P.I.). Vzorky byly inkubovány po 5 hodin při 4 °C. Sto mikrolitrů 10% suspenze Staphylococcus aureus (Pansorbin, Calbiochem.) v 0,15 M NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 0,2 % Triton X-100 bylo přidáno ke každé zkumavce. Vzorky byly inkubovány další jednu hodinu ^{divnou při} 4 °C. Imunní komplexy byly peletovány odstředováním při 13000 x g po 5 minut. Supernatanty byly transferovány do nových zkumavek a inkubovány s 5 μl králičího polyklonálního antisera (č. 1381 TB4), čištěného jako v příkladu 1, proti hSCF κ 1-162 z CHO přes noc při 4 °C. 100 μl Pansorbinu bylo přidáváno po 1 hodinu a imunní komplexy byly peletovány jako dříve. Pelety byly promyty 1x puřrem pro lýzi (0,50 N-deoxycholát, 0,5% NP-40, 50 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8, 3x promývacím puřrem (0,5M NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 0,2% Triton X-100) a 1x 20 mM Tris pH 7,5. Pelety

byly resuspendovány v 50 μ l 10 mM Tris pH 7,5, 0,1% SDS, 0,1M β -merkapt ethanolu, SCF protein byl eluován varem po 5 min. Vzorky byly odstředěny při 13000 x g po 5 minut a supernatanty byly odstraněny.

Ošetření glykosidázami bylo provedeno následovně: tři mikrolitry 75 mM CHAPS, obsahujícího 1,6 mU O-glykanázy, 0,5 U N-glykanázy a 0,02 U neuraminidázy, byly přidány ke 25 μ l imunního komplexu a inkubováno bylo po 3 hodiny při 37 °C. Byl přidán stejná objem 2xPAGE vzorkového pufru a vzorky byly povařeny 3 minuty. Štěpené a neštěpené vzorky byly zpracovány elektroforézou na 15% SDS-polyakrylamidovém redukčním gelu přes noc při 8 mA. Gel byl fixován v methanolu-kyselině octové, zpracován s NEN po 30 minut, sušen a exponován při -70 °C na film Kodak XAR-5.

Obrázek 43 představuje autoradiograf výsledků. Dráhy 1 a 2 jsou vzorky z kontrolních COS/pDSR α 2 kultur, dráhy 3 a 4 z COS/pDSR α 2 hSCF^{K1-248}, dráhy 5 a 6 z CHO/pDSR α 2hSCF^{I-164}. Dráhy 1,3 a 5 jsou neštěpené imunní sraženiny, dráhy 2,4 a 6 byly štěpeny glykanázami jak je popsáno výše. Polohy markerů molekulové hmotnosti jsou označeny nalevo. Příprava SCF v COS transfektovaných pDSR α 2 hSCF^{K1-248} je v souladu s hSCF^{I-164} sekretovaným CHO transfektovanými pDSR α 2 hSCF^{I-164} (příklad 11). Tato skutečnost silně naznačuje, že přirozené proteolytické místo uvolňující SCF z buňky je v sousedství aminokyseliny 164.

Příklad 17

Kvarterní strukturní analýza lidského SCF

Při kalibraci filtrační kolony (ACA 54) popsané v příkladu 1 pro čištění SCF z BRL buněčného media se standardy molekulové hmotnosti a při eluci čištěného SCF z jiných kalibrovaných gelových filtračních kolon je zřejmé, že SCF čištěný z BRL buněčného media se projevuje se zřejmou molekulovou hmotností přibližně 70000 až 90000 vztaženo k molekulovým hmotnostem standardů. V protikladu k tomu je zřejmá molekulová hmotnost podle SDS-PAGE přibližně 28000–35000. I když je zjištěno, že glykosylované proteiny se mohou chovat v takových analýzách anomálně, výsledky potvrzují, že krysí SCF odvozený z BRL může existovat jako nekovalentně asociovaný dimer za nedenaturačních podmínek. Podobné výsledky platí pro rekombinantní SCF formy (např. krysí a lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ získaný z E.coli, krysí a lidský SCF¹⁻¹⁶² získaný z CHO buněk) u kterých velikost molekuly stanovená gelovou filtrací za nedenaturačních podmínek je přibližně dvakrát větší než stanovená gelovou filtrací za denaturačních podmínek (tj. za přítomnosti SDS) nebo pomocí SDS-PAGE, v každém jednotlivém případě. Dále sedimentační rychlostní analýza, která poskytuje přesné stanovení molekulové hmotnosti v roztoku, poskytuje hodnotu asi 36000 pro molekulovou hmotnost rekombinantního lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ získaného z E.coli. Tato hodnota je opět přibližně dvojnásobná než poskytnutá z SDS-PAGE (asi 18000–19000). Proto i když je možno připustit, že mohou existovat násobné oligomerní stavy (včetně monomerního stavu), je zřejmé, že dimerní stav v roztoku za určitých okolností převládá.

Příklad 18

Izolace klonů cDNA lidského SCF z buněčné linie 5637

A. Konstrukce 5637 cDNA knihovny

Čelková RNA izolovaná z lidské krevní karcinomové buněčné linie 5637 (ATCC HTB-9) extrakční metodou, využívající kyselý guanidiniumthiokyanát-fenol-chloroform (Chomczynski a spol., Anal.Biochem., 162, 15 (1987)) a poly(A) RNA byla získána za použití oligo(dT) kolony získané od Clontech. Dvojřetězcová cDNA byla připravena ze 2 µg pol(A) RNA s BRL cDNA syntézním kitem za podmínek doporučených dodavatelem. Přibližně 80 ng na koloně frakcionované dvouřetězcové cDNA s průměrnou velikostí 2 kb bylo ligováno ke 300 ng SalI/NotI štěpeného vektoru pSPORT 1 /D'Alessio a spol., Focus, 12, 47-50 (1990)) a transformováno do DH5α buněk elektroporací (Dower a spol., Nucl.Acids Res., 16, 6127-6145 (1988)).

B. Screening cDNA knihovny

Přibližně $1,5 \times 10^5$ primárních transformantů bylo rozděleno do 30 poolů, kde každý přibližně obsahoval 5000 individuálních klonů. Plasmidová DNA byla připravena z každého poolu CTAB-DNA srážením, které je popsáno (Del Sal a spol., Biotechniques, 7, 514-519 (1989)). Dva mikrogramy každé plasmidové DNA z poolu byly štěpeny restriční enzymem NotI a separovány gelovou elektroforézou. Linearizovaná DNA byla transferována na GeneScreen Plus membránu (DuPont) a hybridizována ^{32}P -značenou cDNA celé délky lidského SCF izolovanou z HT1080 buněčné linie (příklad 16) za již popsaných podmínek (Lin a spol., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82,

7580-7584 (1985)). Hybridizací bylo identifikováno sedm poolů, obsahujících pozitivní signál. Pooly kolonií byly rescreenovány ^{32}P značenou PCR získanou cDNA lidského SCF (příklad 3) postupem hybridizace kolonií (Lin a spol., Gene, 44, 201-209 (1986)) dokud nebyla získána jedna kolonie ze čtyř poolů. V velikosti inzertu ze čtyř izolovaných klonů jsou přibližně 5,3 kb. Stěpení restričním enzymem a nukleotidová analýza 5'-konce klonů prokazuje, že čtyři klony jsou identické. Sekvence této lidské cDNA je uvedena na obr. 44. cDNA na obr. 44 koduje polypeptid, ve kterém aminokyseliny 149-177 sekvence na obr. 42 jsou nahrazeny jediným Gly zbytkem.

Příklad 19

Vliv SCF na přežití po letální iradiaci

A. Účinek in vivo SCF na přežití po letální iradiaci

Vliv SCF na přežití myši po letální iradiaci byl testován. Použité myši byly 10 až 12 týdnů staré samice Balb/c. Byly použity skupiny 5 myší ve všech pokusech a myši byly před každým pokusem zváženy. Myši byly ozářeny 850 rad nebo 950 rad v jedné dávce. Myším byly injektovány samotné faktory nebo faktory plus normální Balb/c buňky kostní dřeně. V prvním případě byly myši injikovány intravenózně 24 hodin po ozáření krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ (20 $\mu\text{g/kg}$), čištěným z *E.coli* a modifikovaným přídavkem polyethylenglykolu jako v příkladu 12, nebo salinickým roztokem u kontrolních zvířat. Pro transplantační model byly myši injikovány i.v. různými dávkami buněk normální Balb/c kostní dřeně 4 hodiny po ozáření. Ošetření s krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ bylo provedeno přidáním 200 $\mu\text{g/kg}$ krysího PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ k suspenzi buněk 1 hodinu před

injekcí a podáno jako jednotlivé i.v. injekce faktoru plus buněk.

Po ozáření při 850 rad byly myši injikovány krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ nebo salinickým roztokem. Výsledky jsou uvedeny na obr. 45. Injekce krysího PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ výrazně zvyšuje dobu přežití myši ve srovnání s kontrolními zvířaty (p 0,0001). Myši injikované salinickým roztokem přežívají průměrně 7,7 dne, zatímco krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ ošetřené myši přežívají v průměru 9,4 dne (obr. 45). Výsledky uvedené na obr. 45 představují souhrn ze 4 oddělených pokusů se 30 myšmi v každé ošetřované skupině.

Zvýšení přežití myši s krysím potvrzuje účinek PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ SCF na buňky kostní dřeně u ozářených zvířat. Předběžná studie hematologických parametrů těchto zvířat ukazuje slabá zvýšení ladin destiček ve srovnání s kontrolními zvířaty 5 dnů po ozáření, nicméně 7 dnů po ozáření nejsou hladiny destiček výrazně rozdílné od kontrolních zvířat. Nebyly detekovány žádné rozdíly v RBC nebo WBC hladinách nebo buněčné stavbě kostní dřeně.

B. Přežití transplantovaných myši ošetřených SCF

Dávky 10 % buněk kostní dřeně femuru normálních Balb/c myši, transplantované do myši ozářených při 850 rad mohou zachránit 90 % nebo více zvířat (data nejsou uvedena). Proti byla použita dávka ozáření 850 rad s transplantační dávkou 5 % femuru ke studiu účinků krysího PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ na přežití. Při této buněčné dávce bylo předpokládáno, že velké procento myši, které nedostanou SCF nepřežije; v případě, že krysí PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ by mohl stimulovat transplantované buňky, mohlo

by se přežití zvýšit. Jak je uvedeno na obr. 46, přibližně 30 % kontrolních myší přežívalo 8 dní po ozáření. Ošetření krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ mělo za následek výrazné zvýšení přežití s více než 90 % myší, které přežívají více než 30 dní (obr. 40). Výsledky uvedené na obr. 46 představují kompilaci výsledků ze 4 separátních pokusů, kde bylo použito 20 myší jak u kontrolní myši tak u myší ošetřených krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴. Při vyšších dávkách ozáření, ošetření myší krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ v souvislosti s transplantací dřeně také vede ke zvýšenému přežívání zvířat (obr. 47). Kontrolní myši ozářené 950 rad a s transplantací 10 % femuru uhynuly 8.den, zatímco přibližně 40 % myší ošetřených krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ přežívalo 20 dní nebo déle. 20 % kontrolních myší s transplantovanými 20 % femuru přežívalo po 20 dní, při ošetření rSCF přežívalo 80 % pokusných zvířat (obr. 47).

Příklad 20

Tvorba monoklonálních protilátek vůči SCF

8 týdnů staré samice BALB/c myší (Charles River, Wilmington, MA) byly subkutánně injektovány 20 µg lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ exprimovaného v E.coli v kompletním Freudově adjuvans (H37-Ra; Difco Laboratories, Detroit, MI). Další imunizace 50 µg stejného antigenu v nekompletním Freudově adjuvantu byly následně podány 14., 38. a 57.den. Tři dny po poslední injekci byly 2 myši usmrceny a jejich slezinné buňky fúzovány se sp 2/0 myelomovou linií postupem popsáným Nowinskim a spol., (Virology 93, 111-116 (1979)).

Medium použité pro buněčnou kulturu sp 2/0 a hybridomy bylo Dulbecco modifikované Eaglovo medium (DMEM), (Gibco,

Chagrin Falls, Ohio) doplněné 20 % teplem inaktivovaného fetálního hovězího sera (Phibro Chem., Fort Lee, NJ), 110 mg/ml pyruvát sodný, -100 U/ml penicilin a 100 mcg/ml streptomycin (Gibco). Po buněčné fúzi byly hybridomy selektovány v HAT mediu, obsahujícím 10^{-4} M hypoxanthinu, 4×10^{-7} aminopterinu a $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidinu, po dobu dvou týdnů, pak kultivovány v mediu, obsahujícím hypoxanthin a thymidin po dva týdny.

Hybridomy byly screenovány následovně: polystyrenové desky (Costar, Cambridge, MA) byly senzitivizovány 0,25 μ g lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ (E.coli) v 50 μ l 50 mM hydrogenuhličitnanového pufru pH 9,2 po dvě hodiny při teplotě místnosti, pak přes noc při 4 °C. Plotny pak byly blokovány 5 % BSA v PBS po 30 minut při teplotě místnosti, pak inkubovány se supernatantem hybridomové kultury po jednu hodinu při 37 °C. Roztok byl dekantován a navázané protilátky inkubovány s 1:500 ředěním kozí-anti-myší IgG konjugovaného s křenovou peroxidázou (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) po jednu hodinu při 37 °C. Plotny byly promyty promývacím roztokem (KPL, Gaithersburg, MD), pak vyvíjeny se směsí H₂O₂ s ABTS (KBL). Kolorimetrie byla provedena při 405 nm.

Kultury hybridomových buněk sekretujících protilátku specifickou pro lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ (E.coli) byly testovány ELISA jakož i postupy screeningu hybridomů, na křížové reaktivity k lidskému SCF¹⁻¹⁶² (CHO). Hybridomy byly subklonovány limitní ředící metodou. 55 jamek hybridomového supernatantu je v testu silně pozitivní k lidskému SCF¹⁻¹⁶⁴ (E.coli); 9 z nich je křížově reaktivních k lidskému SCF¹⁻¹⁶² (CHO).

Některé hybridomové buňky byly klonovány následovně:

Monoklonální	IgG isotyp	reaktivita k lidskému SCF ¹⁻¹⁶² (CHO)
4G12-13	IgG1	ne
6C9A	IgG1	ne
8H7A	IgG1	ano

Hybridomy 4G12-13 a 8H7A byly uloženy v ATCC 26.zář 190.

I když předložený vynález byl popsán výhodnými provedeními, je nutno upozornit, že odborníkům budou zřejmě další modifikace a variace tohoto provedení. Předložené nároky pokrývají všechny takové možné variace, které spadají do rozsahu předloženého vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Čištěný a izolovaný polypeptid mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence uvedené na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hematopoietickou biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk.

2. Polypeptid podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci.

3. Polypeptid podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny, zahrnující následující sekvence vzhledem k aminokyselinové sekvenci na obr. 14C: 1-248, 1-193 a 1-162, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci.

4. DNA sekvence pro použití při expresi polypeptidu podle kteréhokoliv z předchozích nároků v prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňce, kde uvedená DNA sekvence je vybrána z:

(a) DNA sekvencí uvedených na obr. 14C nebo jejich komplementárních řetězců,

(b) DNA sekvencí, které za stringentních podmínek hybridizují k DNA sekvencím definovaným pod (a) nebo jejich fragmentů a

(c) DNA sekvencí, které nebýt degenerace genetického kódu by hybridizovaly k DNA sekvencím definovaným v (a) a (b), přičemž tyto sekvence kódují polypeptid, mající stejnou aminokyselinovou sekvenci.

5. DNA sekvence podle nároku 4 zahrnující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v ne-savčích buňkách.

6. DNA sekvence podle nároku 5 obsahující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v E.coli buňkách.

7. DNA sekvence podle nároku 4, 5 nebo 6 obsahující jeden nebo více kodonů preferovaných pro expresi v kvasin-
kových buňkách.

8. DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 4, 5
nebo 6, která kóduje expresi methionylového zbytku v
N-terminální poloze maturované verze uvedeného polypeptidu.

9. DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 4 až
8, kovalentně spojená s detegovatelným značením.

10. DNA sekvence podle nároku 9, kde značení je
radioaktivní značení.

11. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že obsahuje účinné množství polypeptidu podle
kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a farmaceuticky přijatelné
ředidlo, přísadu nebo nosič.

12. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků
1 až 3 pro výrobu léčiva pro hematopoietickou terapii savce.

13. Použití podle nároku 12 pro výrobu léčiva
pro léčbu leukopenie, léčbu trombocytopenie, léčbu anemie,
zvýšení příjmu transplantátu kostní dřeně, zvýšení obnovy
kostní dřeně při léčbě ozařováním, chemicky nebo chemote-
rapeuticky indukované aplasie kostní dřeně nebo myelosuprese
a citlivosti buněk k chemoterapii.

14. Použití podle nároku 13 pro výrobu léčiva pro
zvýšení počtu buněk schopných transplantace po aspiraci
kostní dřeně nebo periferní krevní leukoferesi.

15. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro výrobu léčiva pro léčení AIDS, myelofibrosis, myelosklerosy, osteoporosy, metastatického karcinomu, akutní leukemie, mnohotného myelomu, Hodgkinovy choroby, lymfomu, Gaucherovy choroby, Niemann-Pickovy choroby, Letterer-Siwovy choroby, odolné erythroblastické anemie, Di Guglielmova syndromu, kongestivní splenomegalie, Kala azar, sarkoidosy, primární splenické pancytopenie, miliární tuberkulózy, rozseté plísňové choroby, prudké septikémie, malarie, deficiencie vitamínu B₁₂, deficiencie kyseliny folové a pyridoxinové deficiencie u savců.

16. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro výrobu léčiva pro léčení poškození nervů, infertility nebo intestinálního poškození u savců.

17. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro výrobu léčiva pro léčení hypopigmentační poruchy.

18. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 17 pro výrobu léčiva dále obsahujícího alespoň jeden další hematopoietický faktor vybraný z EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 a IGF-1.

19. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 17 pro výrobu léčiva dále obsahujícího alespoň jeden další hematopoietický faktor vybraný z IL-8, IL-9 a IL-10.

20. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 17 pro výrobu léčiva dále obsahujícího alespoň jeden další hematopoietický faktor vybraný z IL-11 a LIF.

Anotace

286303

28838

Název vynálezu: Čištěný a izolovaný polypeptid, jeho
použití, DNA sekvence pro jeho expresi
a farmaceutická kompozice

Čištěný a izolovaný polypeptid mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence uvedené na obr. 14C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hematopoietickou biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk. Použití tohoto polypeptidu pro výrobu léčiva pro hematopoietickou terapii savce. Farmaceutická kompozice obsahující účinné množství tohoto polypeptidu a farmaceuticky přijatelné ředidlo, přísadu nebo nosič. DNA sekvence pro použití při expresi tohoto polypeptidu v prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňce.

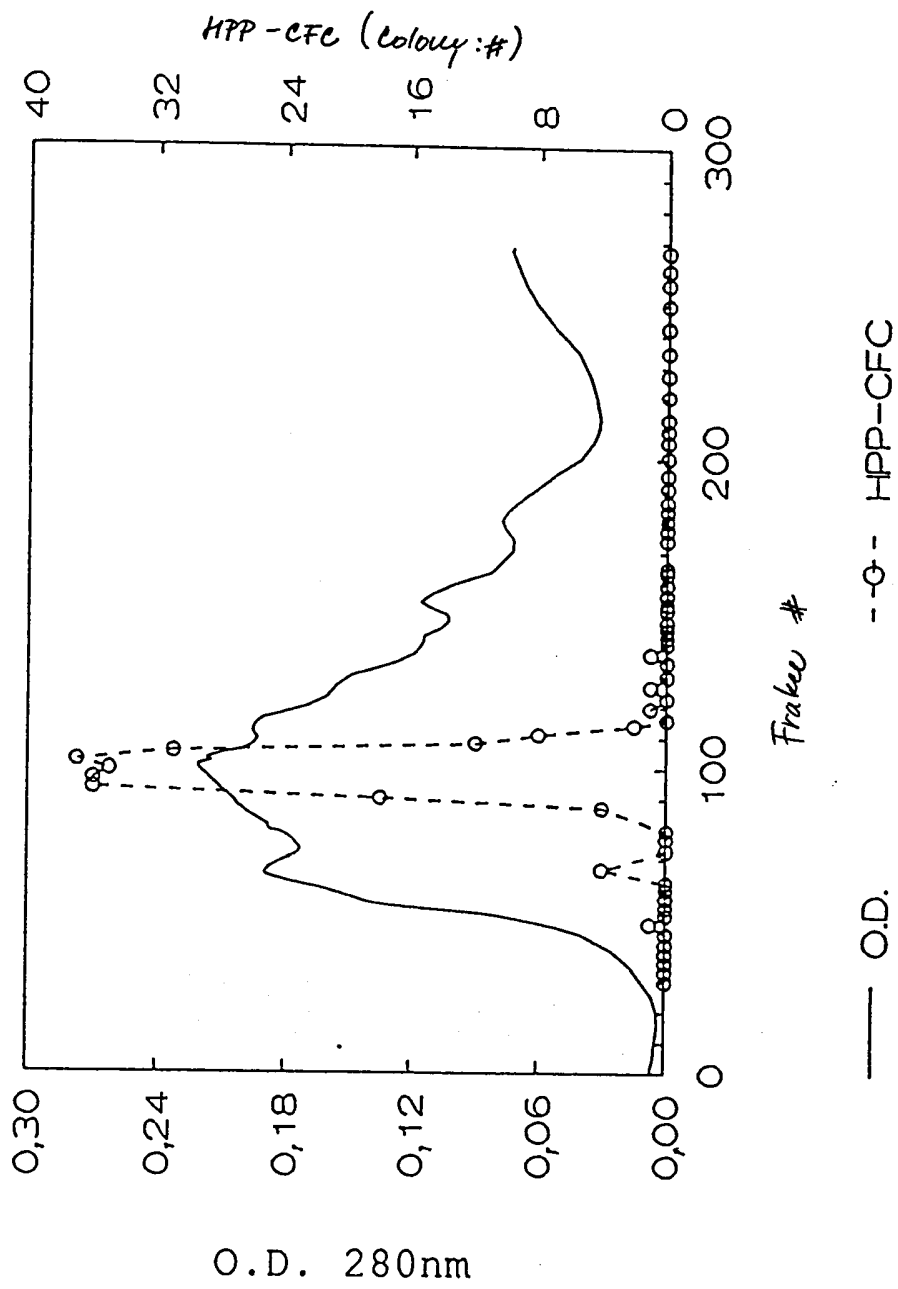


17

DISC PV 488-94

60271

Obr. 1

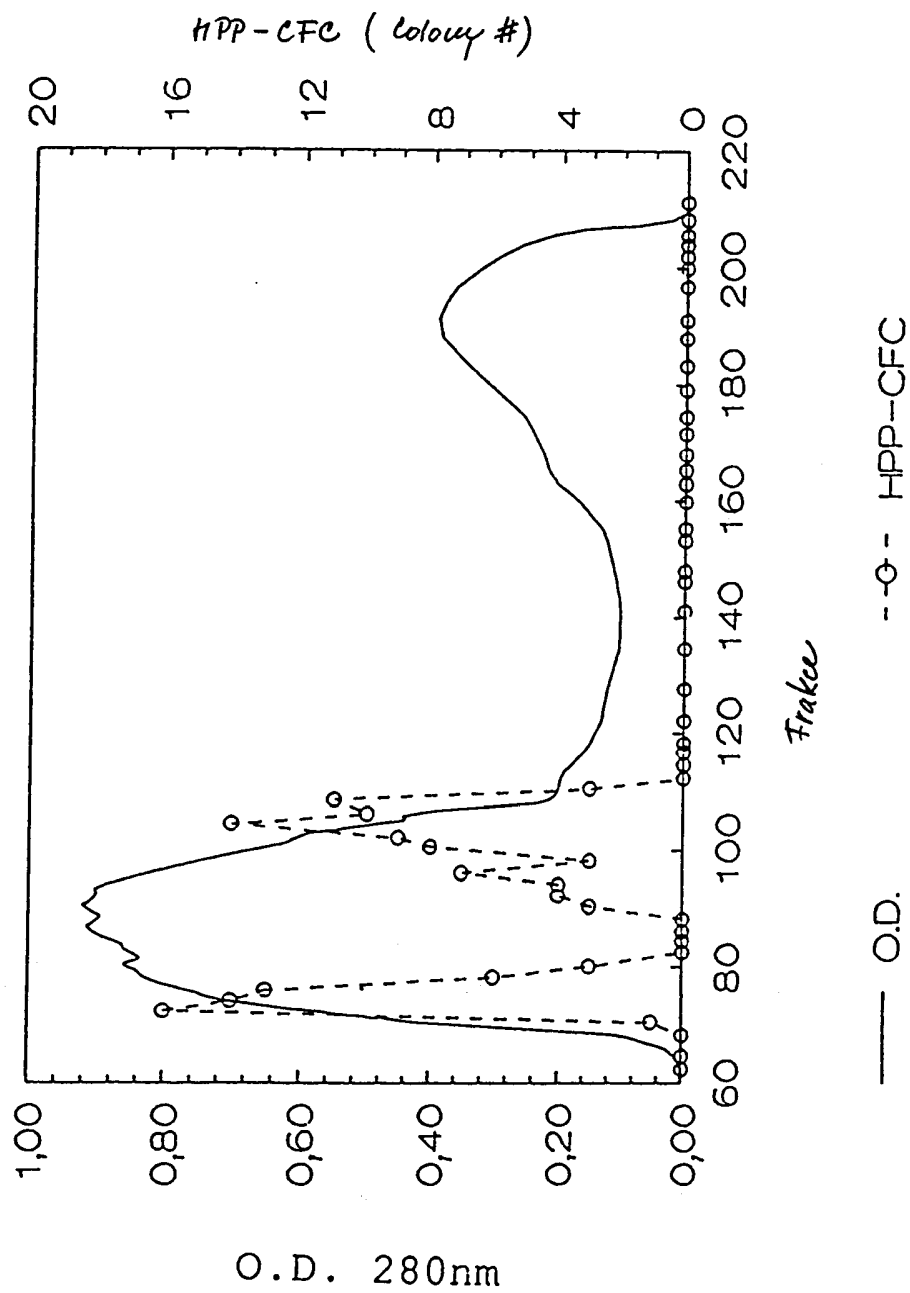


152

DSK PV488-94

60241

Obr. 2

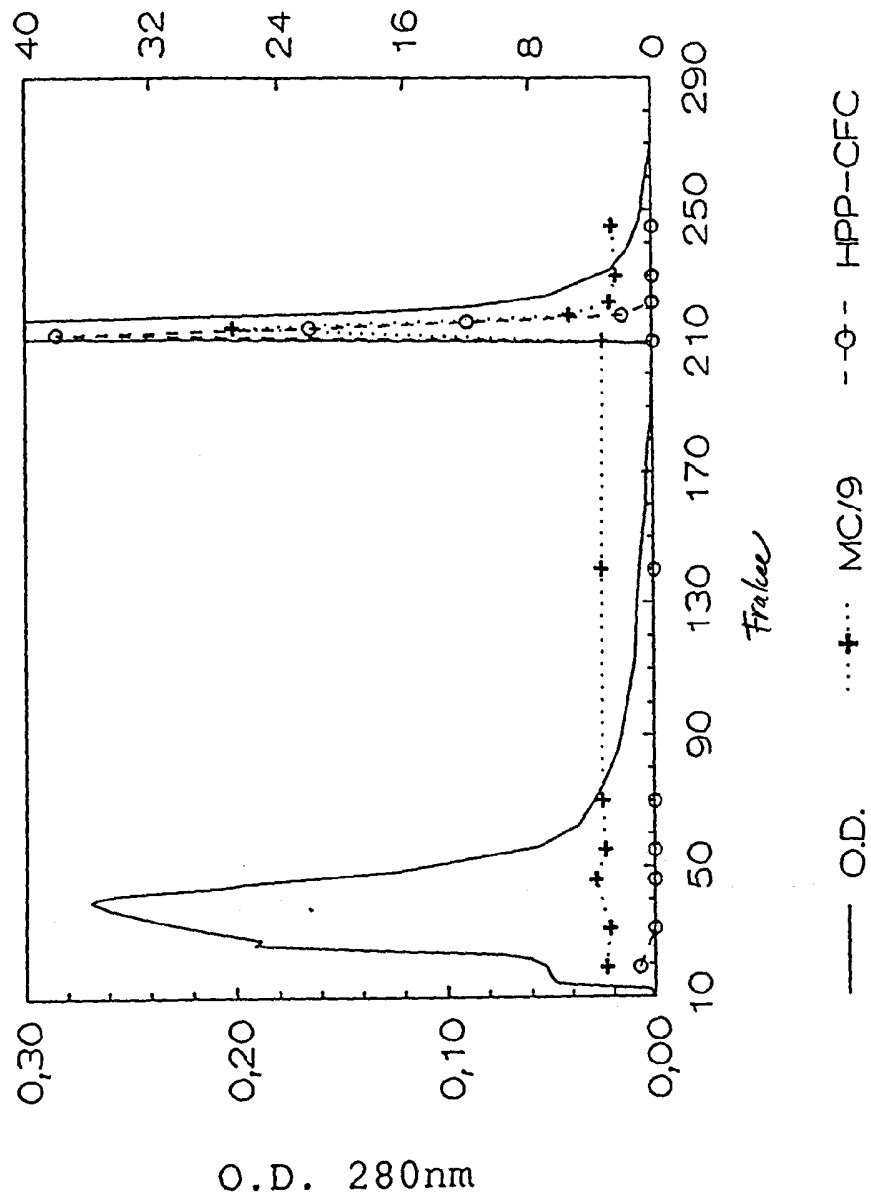


153

TSK PV488-97

60

Obr. 3

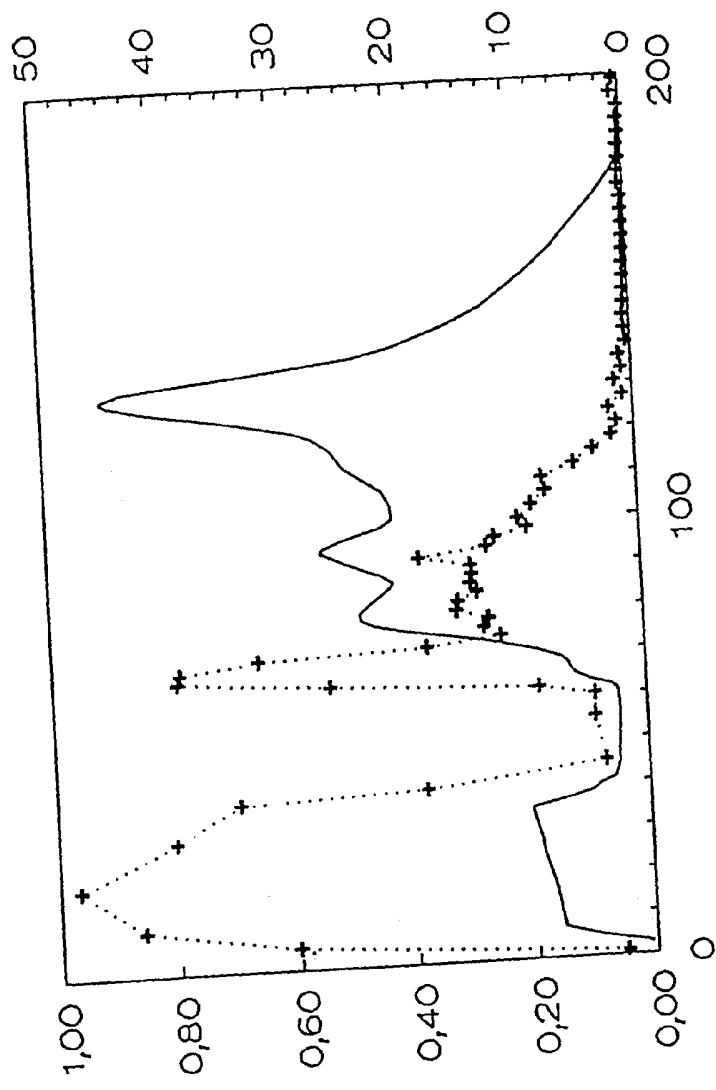
MC9 CPM ($\times 10^{-3}$) nebo HPP-CFC (Col.#)

159

77K PV488-94
60241

Obr. 4

MC/9 CPM ($\times 10^{-3}$)



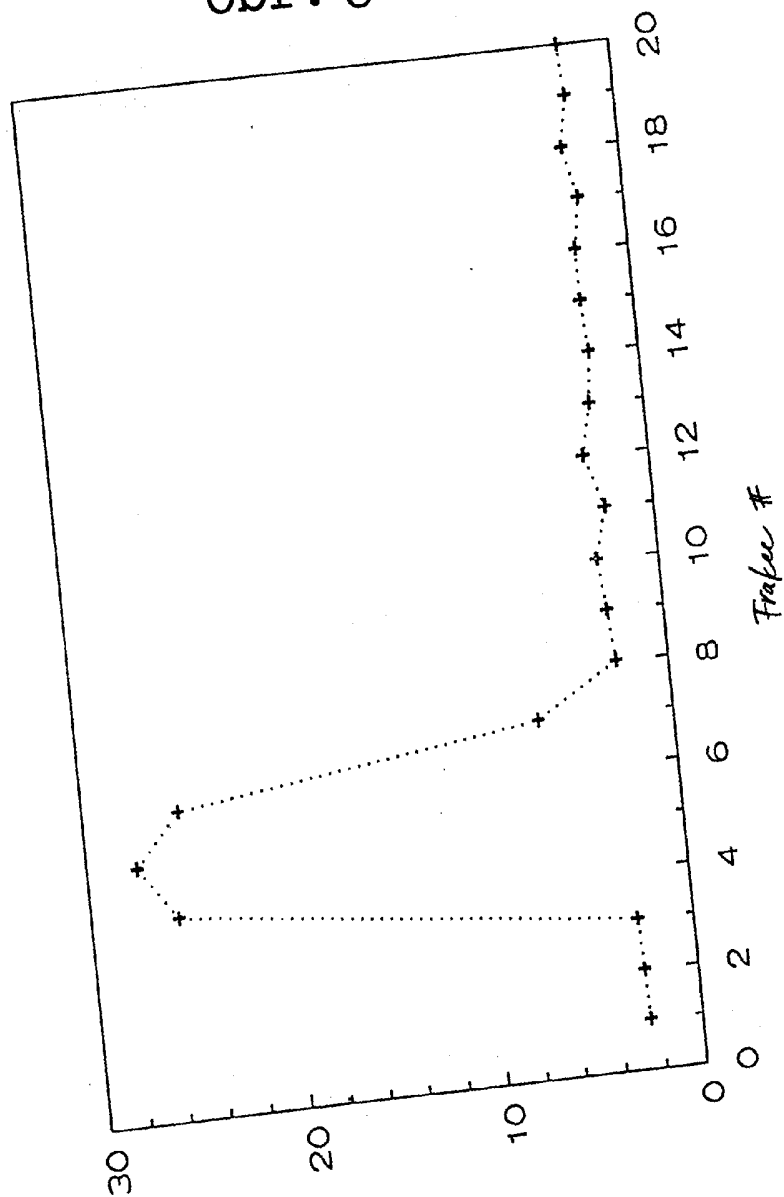
O.D. 280nm ($\times 10^1$)

....+... MC/9

— O.D.

157 75K PV488-97
~~6044~~

Obr. 5



MC/9 CPM ($\times 10^{-3}$)

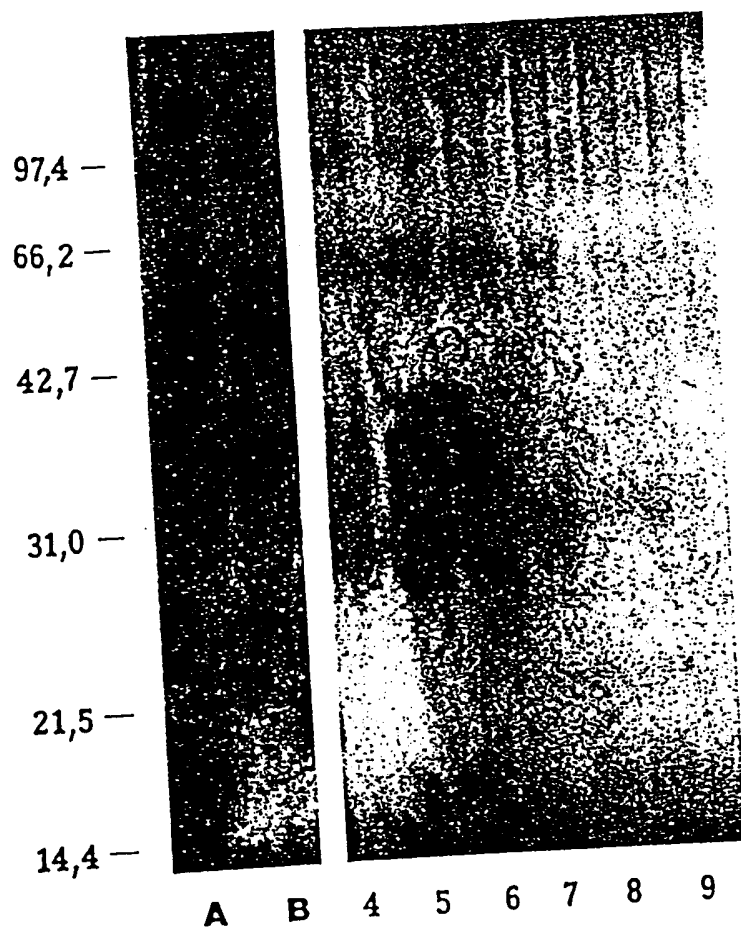
156

TISK

PV488-97

~~60471~~

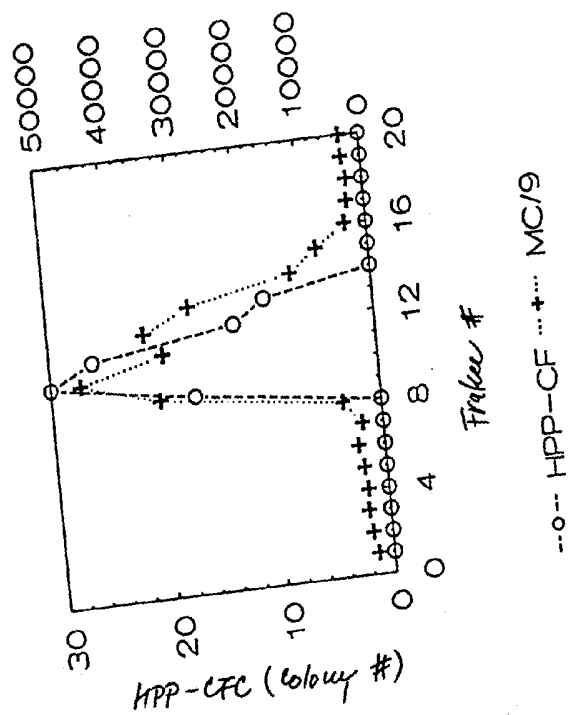
Obr. 6



157 disk PV488-94
60241

Obr. 7

MC/9 CPM



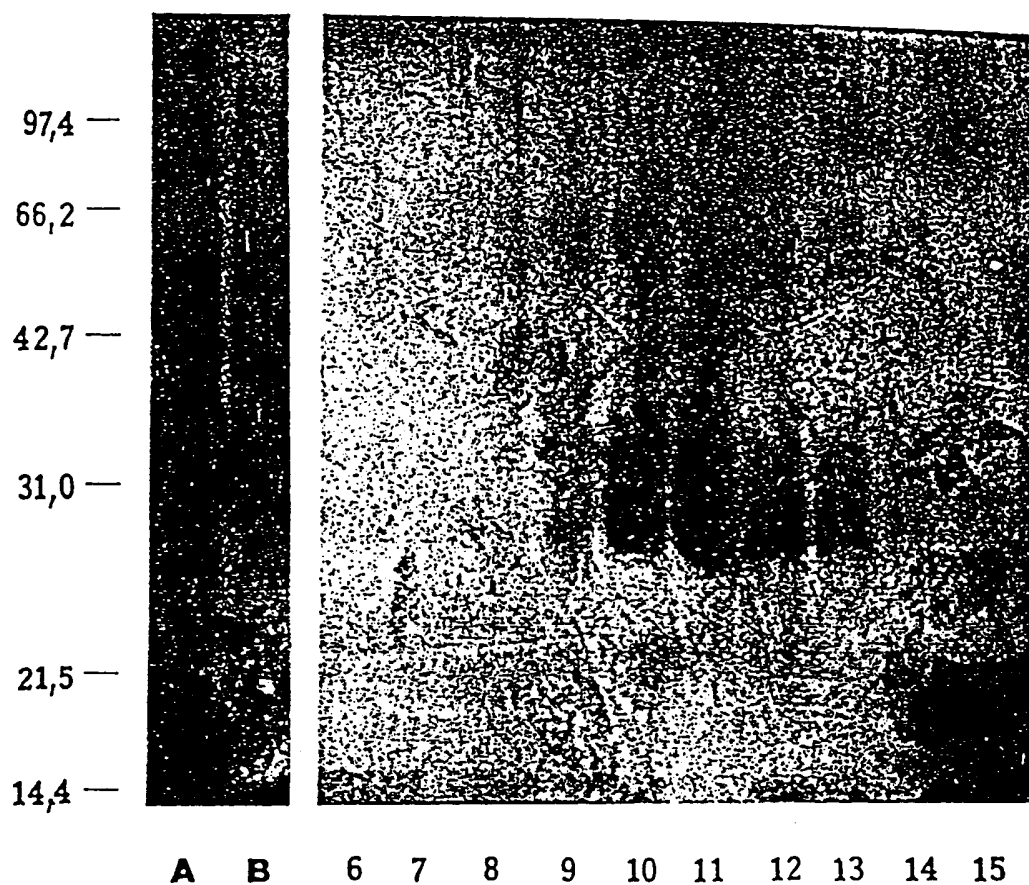
178

DSK

PV488-97

6027

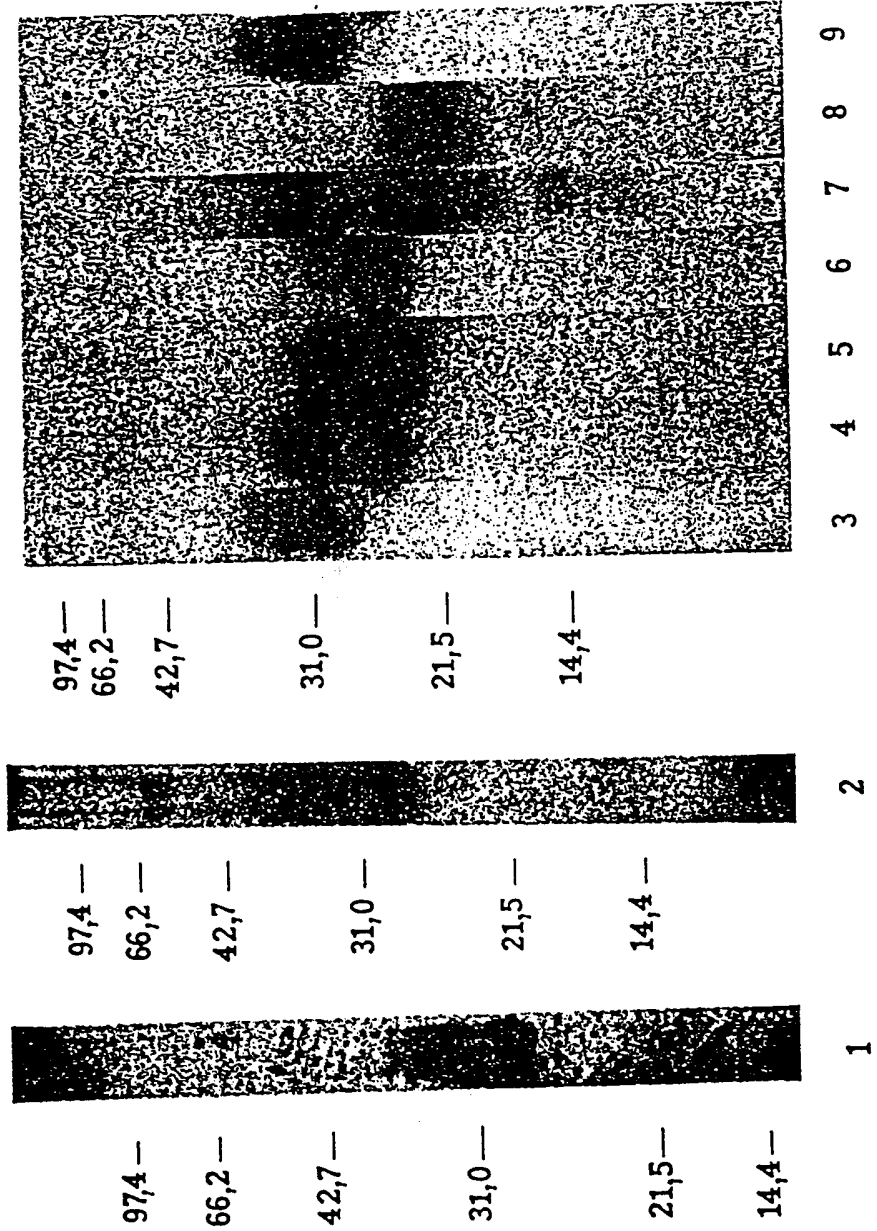
Obr. 8



159

775K PV488-97 60241

Obr. 9

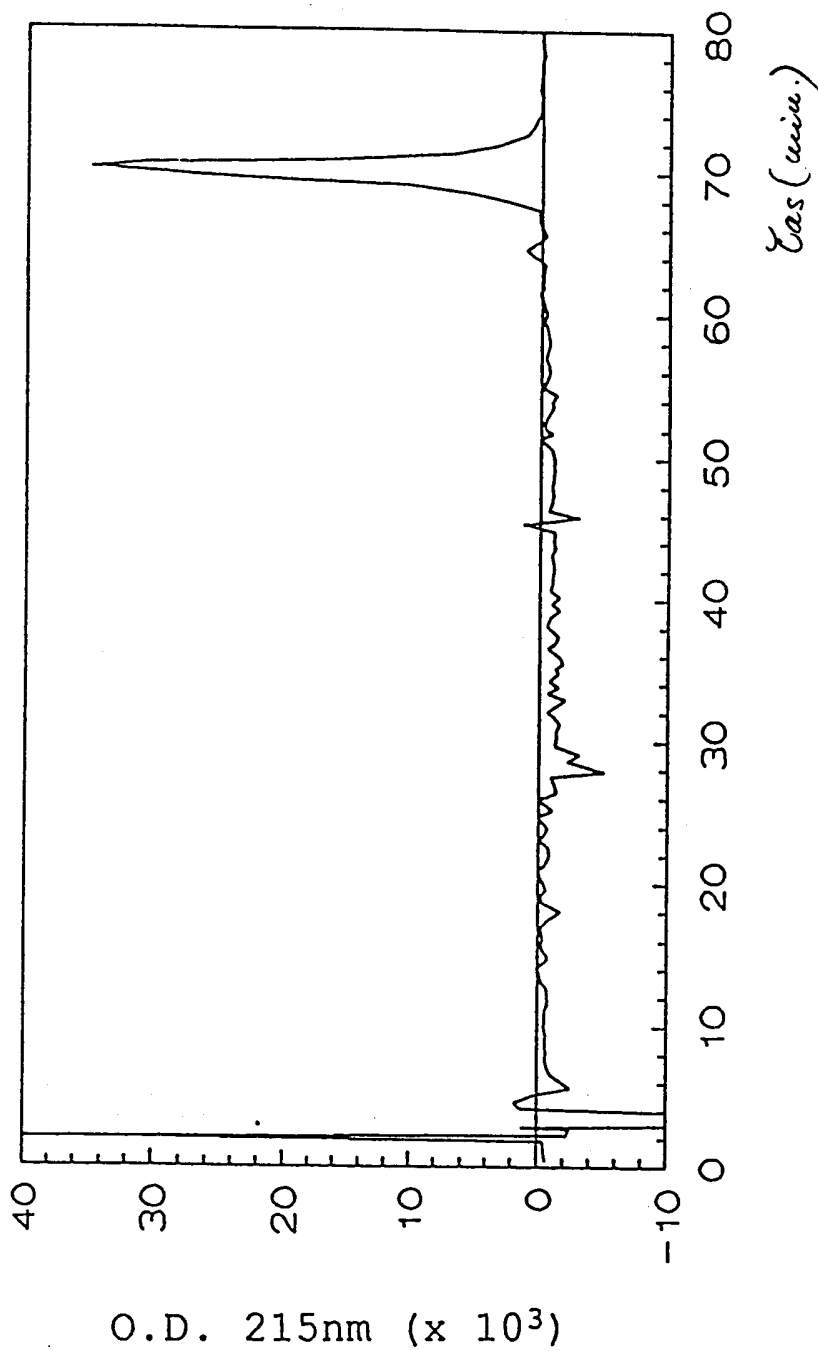


160

TSK 7U488-97

60247

Obr. 10



161

TSIC: PV 488-97

~~6044~~

Obr. 11

```

1          10          20
pE E I C R N P V T D N V K D I T K L V A N L P N D
|-----|
          30          40          50
Y M I T L N Y V A G M D V L P S H C W L R D M V T
          ----->
          |-----|
          |----- T-5a -----|
          |----- CB-6a -----||----- CB-8; CB-10 -----|
          60          70
H L S V S L T T L L D K F S N I S E G L S N Y S I
-----|-----|
          80          90          100
I D K L G K I V D D L V A C M E E N A P K N V K E
----->
          |----- T-3 -----|
          |-----|
          |----- CB-14; CB-15; CB-16 -
          |----- S-1 -----|
          110          120
S L K K P E T R N F T P E E F F S I F N R S I D A
--- T-1 -----||----- T-4 (N109 -----||-----|
----- T-7 (N120 ; T-8 (N109 -----|
----- CB-14; CB-15; CB-16 -----|
|----- S-5 or S-6 (N109 -----|
          130          140          150
F K D F M V A S D T S D C V L S S T L G P E K D S
----- T-5b -----|
-----||----- CB-6B -----|
----- S-5 S-6 -----|
          160
R V S V T K P F M L P P V A (A)
---||----- T-2 ---| <-- <--
----- CB-6B -----|
----- S-2 -----|

```

Obr. 12A

219-21	ACATTCTTIGGIGCATTCCTCCAT G T G T T	393-368
219-22	AAAACTCCTCIGGIGTAAATT G T T G G	447-425
219-25	GTTCNGGTTTTT C C C	420-407
219-26	ATGGAAGAAAACGCCCCCAAAACGT G G T G T	368-393
222-11	CCNAATGATTATATGATAAC C C C C T	167-186
222-12	GGNGGNAACATAAANGGCTT G G T	566-585
223-6	ACCATAAAATCTTTAAICGATC G G C G G	492-470
224-24	GTATTTTCAATAGATCCATTGA	450-471
224-25	CCAACATGTCGCC	190-202
224-27	GTAGTCAAGCTGACTGATAAG	273-253

162

715K

PV.488-94

6047

163

DSK PV488-94

~~6024~~

Obr. 12A pokrač.

224-28	TAACCAACAATGACTAGGCAA	235-215
225-31	TTCCAGAGTCAGTGTC	547-562
227-29	GCGAAGCTTGCCTTTCCTTATGAAGAAGA	16-35 *
227-30	GCGCCGCGGTACGGTGGTAACATGAAGGGCTTTGTGA	586-561 *
228-30	GATAAATGCAAGTGATAATCC	45-65
230-25	GCGGTCGACCCGCGGAACCTTTAAGTCCATGCAACAC	705-685 *
237-19	CACCCGCGGTATGCAACAGGGGGTAACATAAATGG	569-592 *
237-20	CACCCGCGGTAGGCTGCAACAGGGGGTAACATAAA	572-595 *

164

TISK PU 488-97

~~6047~~

Obr. 12B

231-27	CTTAATGTTGAAGAAACC	703-686
233-13	GATGGTAGTACAATTGTCAGAC	410-431
233-14	GTCTGACAATTGTACTACCATC	431-410
235-29	CAATTTAGTGACGTCTTTTACA	302-323
235-30	TTAGATGAGTTTTCTTTCACGCAC	556-533
235-31	AAATCATTCAAGAGCCCAGAACCC	566-589
236-31	AACATCCATCCCGGGGAC	366-383
238-31	CTGGCAATATTTTAAGTCTCAAGAAGACC	
241-6	GCGCCGCGGCTCCTATAGGTGCTAATTGG	
254-9	CCTCACCAC TGTTTGTGCTGGATCGCA	153-179
262-13	GGTGTCTAGACTTGTGTCTTCTTCATAAGGA	209-190 *

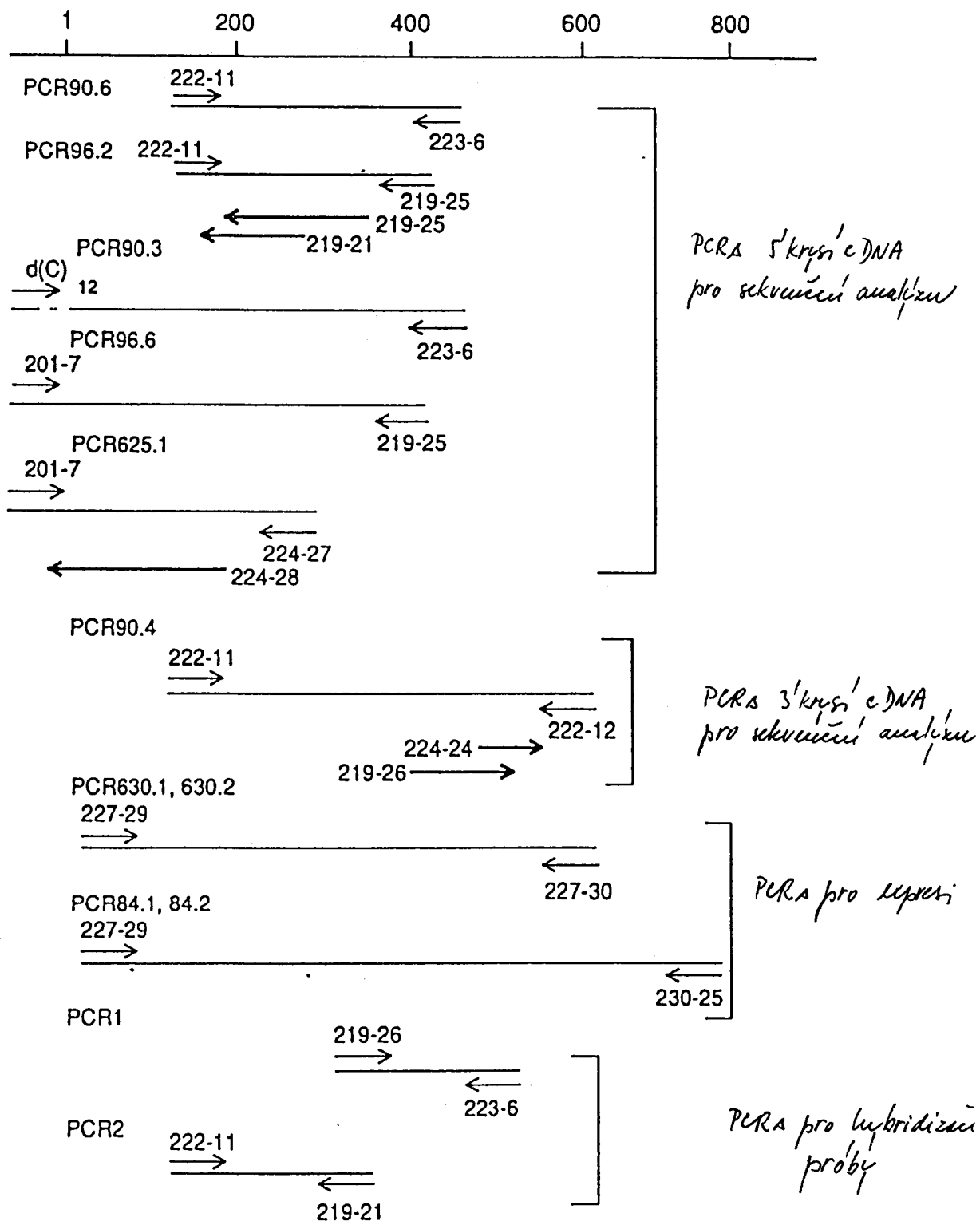
165

DSK PU488-94 6047

Obr. 12C

201-7	CCCCCCCCGG T A
220-3	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGG
220-7	TTTTTTTTTTTTTTTTTTAG
220-11	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCG
221-11	TTCGGCCGATCAGGCCCCCCCCC
221-12	TTCGGCCGATAGGCCTTTTTTTTTTTTTT
228-28	GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT
228-29	GGCCGGATAGGCCTCAC

Obr. 13A

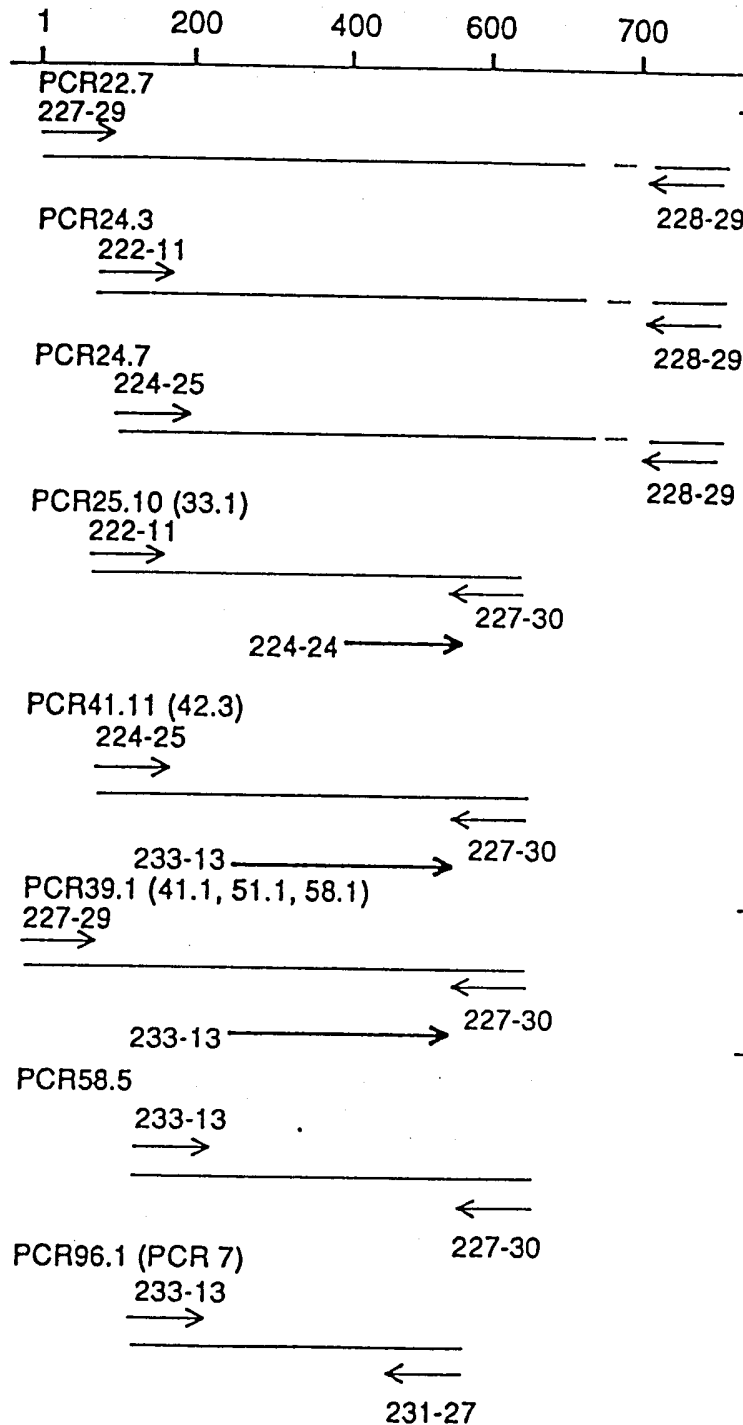


164

77SK PV488-97

60047

Obr. 13B

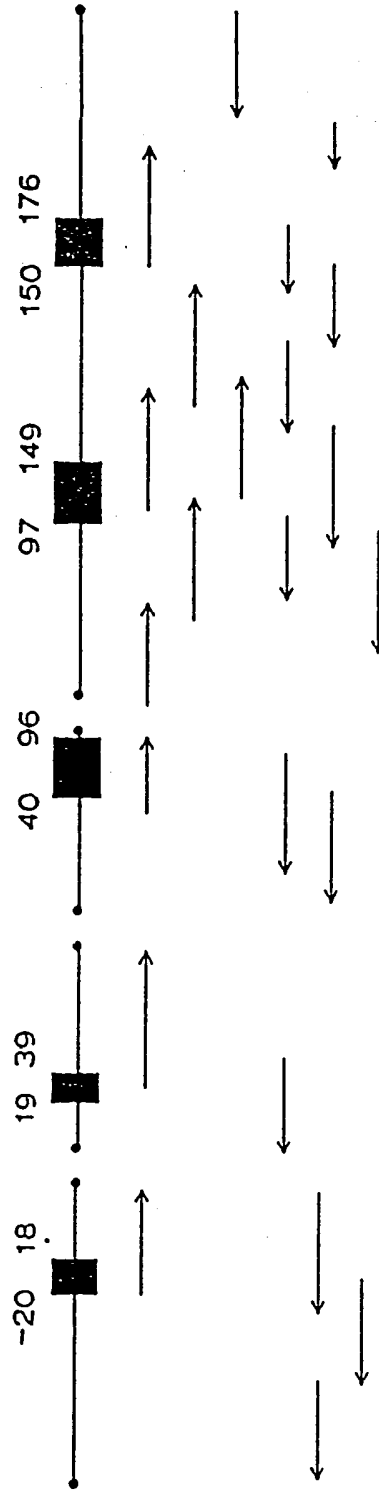


PCRs lidské cDNA
pro sekvenční
analýzu

PCRs pro expresi

PCRs pro hybridizaci
proby

Obr. 14A



168

732

PV488-97

60247

159

TISK

PUY88 97

~~6024~~

Obr. 14B

AAAGTATCTTTCTATTGGCGAAGGACATGTTTTCCcATAAGTGGT	45
AAACAnACTGTCTGCACATAATAATTATCTTGCTGCCGTAAAGAT	90
TAGGTAAATTCTGcCTTCGATCTAAAAACACACCCTTCTGTCAA	135
TCCGAGGAGCAGTGTGCTAGTCTAGAGGTCTAAATGAAGGCTCCT	180
TTCACGGTTGTATTTCTGCTCCCCAAATTGTCCACATTTAAAAGG	225
AGAGTGCTTCTTTTCAGCCTTAGGCTCTGAATTTTCATGCATTCCT	270
CCATTTTCCGAGGTCCCCccCcAAGTGATAATTCTGTTACACGTTG	315
CTACAAGTTCATCCCTAATTGCCGTCAAGAACTGACTGTAGAAG	360
GCTTACCACAGACGTTGTAACCGACAGTAAAGCCATTGAAAGAGT	405
AATTCAAACAGGATGGAAGCCAGGAGTATTTTGTGGCTGTTGCTC	450
TTTTTCTTTTCAGTTTGGTGAGAGCAGCTTGAATGCTTAACATTT	495
AAGCCATCAGCTTAAACAAAACAAAACAAAACAAAAAAAACCC	540
CGCTCTGGCATATTTGCACTTAACACATACGGTATAAGGTGTTAC	585
TGGTTTGCATAGTTCTGGATTTTTTTTTTTTTTAAAACTGATGGAC	630
-20	
ThrTrpIleIleThrC	
ACCAAGAAATGTTTCTGTTCTTTGTTTAGACTTGGATTATCACTT	675
-10	
ysIleTyrLeuGlnLeuLeuLeuPheAsnProLeuValLysThrG	
GCATTTATCTTCAACTGCTCCTATTTAATCCTCTCGTCAAACTC	720
1 10	
lnGluIleCysArgAsnProValThrAspAsnValLysAspIleT	
AGGAGATCTGCAGGAATCCTGTGACTGATAATGTAAAAGACATTA	765
18	
hrLysLeu	

140

DISK PV 488-94 60247

Obr. 14B pokrač. 1

CAAACTGGTAAGTAAAGAATGATTTTGGCATCTATAAGTCTTCC	810
CTGTGCTTGCTGACCACATAGGTTTCAGGGCACTCCCGACAGGAGT	855
TCCCAGCTTTCTAAGATAAGGAATCACTGTACGAGTCTGAAGTGC	900
TTCTTCTGGGCAAATGGGAGATGCTTAGGTCATGGAGGGTTTATC	945
TGTATAACTGGCCCTTTGCACACCAACAAAGTGACTGACTGGCTT	990
TTGCCTGTTACCTACTG	1007

TCTCCAGTCCTGGGCATGGTATATACTTAGGCACCCAAGATTGGA	45
TTTACAACCTCAAGCATTATATATTGGACAACnACGGGGTATGAGA	90
TATTAATGATATGTCAGGTTGGATGGATGAGTTTTCTCAAGAAAT	135

19
Val

TCTCTTGTATTTACTCACGTTTTTCATTTCTTGGTCTCTGTAGGTG	180
--	-----

30

AlaAsnLeuProAsnAspTyrMetIleThrLeuAsnTyrValAla GCGAATCTTCCAAATGACTATATGATAACCCTCAACTATGTCGCC	225
--	-----

39

GlyMetAspValLeu GGGATGGATGTTTTGGTATGTAGTCCACACACTTCTGAGTTGCCT	270
TTTAGTAGCTAATGGGTGACCTGTGCTTATTCACATTGAAGACAT	315
TATTTGCTCTTTGTCGTTTTTAGATGTTGACCTATAATTTTTCCT	360
TCAAGCTGCTGCTAAGATTATCAGTGAGCATTTTCAGTATGTGTTT	405
TAAGCCTACTCATTAAAAGGAAATGGCTCATCTTAGACGTAGCAA	450

147

Obr. 14B pokrač.

CCGATGTTAATTTTTCCCCAGGCATCTCTCAGAGGGACTTGAATG	495
TTAAAATCATGTAAATTTCTCCTTGGCTATGTTATTTCTCATG	540
GCTATGTTATTCCTATTCGTATTTTCAATTTAAAGGGACGGAATATT	585
TATTGTATTTCTGAACTTTTTCAGGCATGCATCCGGGTCTTTGAA	630
TAAAA	635

CACTAAGACTCCTTCTAGTAATGTTTGTAACTCTGTCTGTATCGA	45
ATGTCTTTGAAAACGCAGTGACTAAGCCATAATAATCTTCCACA	90
GAACGTCCAGTGGTTCATGAACTTTGTATGTGGGGGTGGGGCAAG	135
AATTGTCTCACTATTGGTCAAGGAAGAGAAGGTAAGGTATGCAAG	180
GGTGGTTTAATCTTCTTCCGTGGAAGGACAAAATCATCTATCATT	225
TCCTCTGATCTCTATGCATTTGTTTGTGTTTGAAGTGAATCTGACT	270
TGAGCAAGAGTTGGCGTCCTGTGTTCTGAGGAACTCTTTGTCCT	315
GCAGTCAGTGACTAAAAGTGCTGAGAGATCTGAAGAGCACTCTGA	360
ATCTGCCATATTTTAAATAGATGCTTTGTCTTCTCTTGAATTTC	405

40

50

ProSerHisCysTrpLeuArgAspMetValThrHisLeu	
TTCCAGCCTAGTCATTGTTGGTTACGAGATATGGTAACACACTTA	450

60

SerValSerLeuThrThrLeuLeuAspLysPheSerAsnIleSer	
TCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCT	495

70

80

GluGlyLeuSerAsnTyrSerIleIleAspLysLeuGlyLysIle	
---	--

142

DNK PV488-97 6047

Obr. 14B pokrač.3

GAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAACTTGGGAAAATA 540

90

96

ValAspAspLeuValAlaCysMetGluGluAsnAlaProLys
GTGGATGACCTCGTGGCATGTATGGAAGAAAATGCACCTAAGGTA 585

ACTTGGTATTCATCAGAATTATTTTTCTTATACT 619

GAGCTCATGATGAGCAATTCACAACCACTTGTAATTCCAGCTCCA 45

GAGGACATTATCCCCTCTTTGGATGCCATAGGAATCTGCTCTCAA 90

ATATGTAGATACCACCTCTGCCACCTCAGCACATACATACACATA 135

ATTAAAAAATAGAAACATTAAAGGAGTTCCAATCAATCCTTATTC 180

TTTTCTGTATTCAGTATGCCCAGATGTAAATTCTAGGAATATGTT 225

TTAAAGGCTAATTCTTATTTTGTAATAAGCAGCTTTAAAATTCTT 270

AATTGTTTTTTTCGGGTCACCTTATTGTCCTATTGCCACGACATTG 315

TCCTGTCCCATTGTCTGTTATTCCTTCTGTTTTGTTTATTGTTCC 360

CTAGTTACTTTGATCATGAGATTGACCTGTTACCCGTTGTTATTC 405

TCTGTAGCCATTTTGAGTTGTGTCTATTAGAACAGCTGTTAAATT 450

ACTTGAATCATTGAGGACATAGTCAATAATCTATTATGCTGATCC 495

AGTCAAGTCTATGAGTTATTTGAAAACCTAGAATCTTTGTTAATTA 540

97

AsnValLys

TTTGTTTGCTTGTTTGTTTGTTTATTATTTGTCTAGAAATGTAAAA 585

100

110

GluSerLeuLysLysProGluThrArgAsnPheThrProGluGlu

143

DSK PV488-97 60247

Obr. 14B *pkrač. 4*

GAATCACTGAAGAAGCCAGAACTAGAACTTTACTCCTGAAGAA	630
120	
PhePheSerIlePheAsnArgSerIleAspAlaPheLysAspPhe TTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTC	675
130	140
MetValAlaSerAspThrSerAspCysValLeuSerSerThrLeu ATGGTGGCATCTGACACTAGTGATTGTGTGCTCTCTTCAACATTA	720
148	
GlyProGluLysA GGTCCTGAGAAAGGTAAGGCTTTTAAGCATTTCCTTGTTTAAATGT	765
ACATAGAAAGCCTGAACTTCTGTAAGCCTCTACTGCTGAATCAAC	810
TAAATGTGTTGCTGTAGAAAGAACGTGTGGGTTTTTCTGATAAAA	855
ACAAAAAGCAAATATCAATGACTACCAATGATTATTATCTAGCTT	900
GAGAGATATGCCCTAAGACAGCGATTCTCGATATTTCTAAATTAA	945
AGAATTGTGTGATGGTGGCTCACATATTTTCTAACTGTGATATTT	990
GCCAGGAGAGTAGAATAATGTTATTCTTCATCCCCAGAATTCCTA	1035
AGATTTACAGTCTCATGTCTTTTCCATAAGGTTCAAACCTCTGAGA	1080
CTTGAGTTCTGAGCCTCAGCAGGTCATTCTGAATCCCCACTCTCC	1125
CCGAGCTGGGTCCCTATGGGGGAACTAACTTCATTGCTTTCTTTT	1170
AAACATGACGAGTTACCAACAGCTCCTCGCTATTATAAACATGT	1215
TCCTAAGCATGTCTGTGCATGCaATAAGCCTTCACTCTACAAGAC	1260
AGTTATGGTGTATCGCTTGACAAACTGAGCAGCCAAGCTGAGTA	1305
TGAAATAATAATCTAGACTTGGGAGGCAGACCCAGCACCTACTGT	1350
GATATTGCACTTCGCCTTTGGGGGACTCTATGATTCAAAGTTCA	1395

1741

DSK PV 488-97

~~60047~~

Obr. 14B *pokrič.s*

	150	
	spSerArgV	
CCATGTAACACTGACACATTATTGCTTTCTATTTAGATTCCAGAG		1440
	160	
alSerValThrLysProPheMetLeuProProValAlaAlaSerS		
TCAGTGTACAAAAACCATTTATGTTACCCCCTGtGCAGCCAGTT		1485
170	176	
erLeuArgAsnAspSerSerSerSerAsn_		
CCCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACACATATC		1530
TGATTTACTGCATGCATGGCTCCAAGTATCCTCTATAGGAGTGTT		1575
GCATGGACTTAAAGTTTATAAATCACTACTAATAATGCTGTTCTG		1620
TCACTGTTATTCCTTGTATGGGCTTCCTGACAATTAAATATCTGG		1665
TTTGTAGAATCGGATCTCCTTAGAGGTTAAGATGACCATGACAAA		1710
ATTAGGCCAATCAACTTTCTGCGAAGGTTATTTTAAATAAGGCAC		1755
GAAATTAATTGAAGGAAAAAAAAAATACAAGCAAGGCCTTATTTTG		1800
AATCATGGTAGGCTTAAAATAGACTTTGTGGAGAATGTCCCTGAT		1845
CAAAGTGGAGTTTTTCAGATTTCAAGTGCATGTGCTAACTCTCCAC		1890
AATGTCAAGGCTATTTTCAGTTTTGTGTCTCCATATTTACTACTG		1935
CATGTTTGGAAATTTGCTGATGCTGTTAGATTACCTAAGAATGTA		1980
TGTTGAAGAAGAATGGACTTCTTCCCTAAAATTTCTGTCTCTTT		2025
TGcCCAAGAACCCAcGTTTCCTGGAAGACTATCTTATTTTCATGTC		2070
TGTGCAATGATCATTATAAAGATTATTGAATATACTGGAATACT		2115
CTGGTTTCTGTTTTTACAGATTCATAATAGCTTATTCAGTCTTTA		2160
AAGAAAGTTCTCTGAAGTCCATGCTTTAGAATGTTTCTCTATCAA		2205

175

TSK PV488-97 60247

Obr. 14B pokrač.

AACTTGACCTGGACCTTAAATAAAGCTATATTTAGTCTTTTTATC	2250
CCTGAAAAATATATTTACAGTGTAGACATTTGATATACATCTAA	2295
GGGAAGGATGCTGCCAGAATGCTCGGGCTGGCAGTCTACAAAGTC	2340
CACTGCTCTCAGGATGGACTTCTGAAAGCGGAAATTGTGAACTGC	2385
ATGCATATAACATATCAGATCCTCGAGC	2413

Obr. 14C

-25
 M K K T Q T W I I T C I
 CTGGATCGCAGCGCTGCCCTTTCCTTATGAAGAAGACACAAACTTGGATTATCACTTGCCAT 60
 -10
 Y L Q L L L F N P L V K T Q E I C R N P
 TTATCTTCAACTGCTCCTATTAACTCTCTCGTCAAAACTCAGGAGATCTGCAGGAATCC 120
 10
 V T D. N V K D I T K L V A N L P N D Y M
 TGTGACTGATAATGTAAAGACATTACAAACTGGTGGCGAATCTTCCAAATGACTATAT 180
 30
 I T L N Y V A G M D V L P S H C W L R D
 GATAACCCCTCAACTATGTGCGCGGATGGATGTTTGGCCCTAGTCATGTTGGTTACGAGA 240
 50
 M V T H L S V S L T T L L D K F S N I S
 TATGGTAACACACTTATCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTC 300
 70
 E G L S N Y S I I D K L G K I V D D L V
 TGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAACTTGGGAAAATAGTGGATGACCTCGT 360
 90
 A C M E E N A P K N V K E S L K K P E T
 GGCATGTATGGAAGAAAATGCACCTAAGAATGTAAAGAATCACTGAAGAAGCCAGAAAC 420

176

...DISK PV488-97 60247

Obr. 14C *podno.*

110
 R N F T P E E F S I F N R S I D A F K
 TAGAACTTTACTCCTGAAGAATTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCCTTCAA 480

 130
 D F M V A S D T S D C V L S S T L G P E
 GGACTTCATGGTGGCATCTGACACTAGTGATTGTGTGCTCTCTTCAACATTAGGTCCCTGA 540

 150
 K D S R V S V T K P F M L P P V A A S S
 GAAAGATTCCAGAGTCAGTGTCAACAAACCATTATGTATTACCCCTGTTGCAGCCAGTTC 600

 170
 L R N D S S S S N S K Y T Y L I Y C M H
 CCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACACATATCTGATTACTGCATGCA 660

 190 193
 G S K Y P L
 TGGCTCCAAGTATCCTCTATAGGAGTGTTCATGGACTTAAAGTT 705

144

TISK

PV 488-97

6024

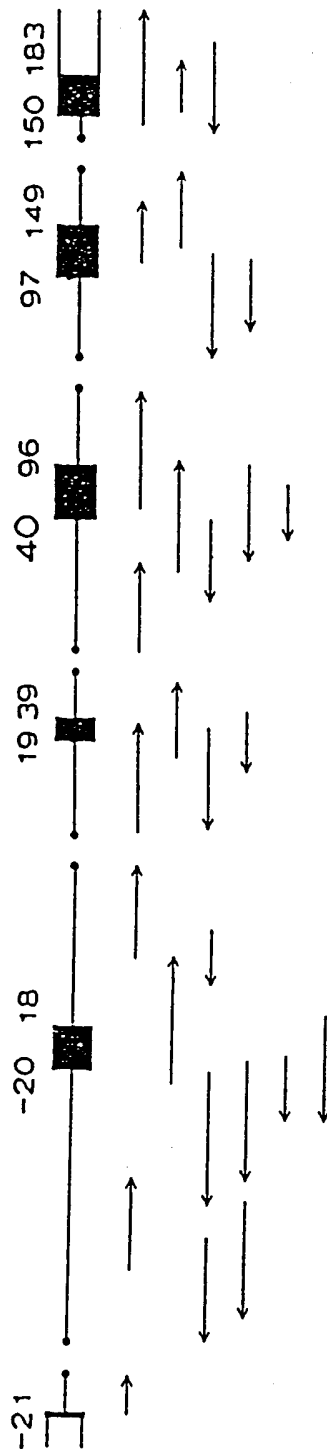
148

715K

PV488-97

~~60241~~

Obr. 15A



179

TISK

PV488-97

60277

Obr.15B

-21
hrGln

CACAAGTGAGTAGGGCGCGCCCGGGAGCTCCCAGGCTCTCCAGGA	45
AAAATCGCGCCCGGTGCCCCGGGGaAGCCGGCGCTCCCTGGGACT	90
TGCAGCTGGGGCGTGCAGGGCTGTGCCTGCCGGGTG	126
AGATACTACAAAGATAAATCAGTTGCACAAGTTCTTGAAACTCTA	45
CAGTGTAATAAGGAAAAATAAGTCATGCATAAAAGCAACTATAAT	90
ACATAATAGAAAATGTTATTTTCAAGCCGATGTGTAGGTTATGTG	135
TGTTTCGAGAGAGAGAGAGAGAAGACAGATTACTTTCTGCTAGGGT	180
TCAAGAATGCCTTCCTGTTGGCTAAGGAAATATTTTCCTTAAGTG	225
GCTAAAAAGCTGTGTTTCAAAATATTCTTTTGATGTCTCACAAAT	270
TCAGTGGAATTCTCTTAGGTCTAAAAATATACATCTCTCTCACTT	315
TAACTTGGTGTGCTATTGTAGATTATTGGATTAAAGCACTGCTCA	360
GGGATTATGCTGCTTCTTGCCAAGCAGTCTACATTTAAAGTAGAA	405
ATAAGATGTTTCTTTTGGTGCCATAAGGTATACATTTTATGCATT	450
CTCTAGTTTTTTAGAAGATACCCTAAGGGCTAAGTCTTTAACATGC	495
TGCTACAAGTTTATTCCCTAATTGCCATTGGGAAATTGGCTGAAGA	540
AAGTTTTTAAACAAAAGTTAACAATATTGTCATTGAGAGAATAATT	585
CAAAATGGATTTTAACTAAAAGCTTTTAAAACTTTGGTGAGCAT	630
AGCTTGAATGCGTAATATTTAATTGCATTTAAGCCAATAACATAT	675

Obr. 15B pokrač. 1

ATTAGACTGGTCTTTTTGTGCATCAAGGCATTAGATGTTAAAAGT	720
TTGAATGATTACAGATCTTAACTGATGATCACCAAGCAATTTTTC	765
-20 ThrTrpIleLeuThrCysIleTyrLeuGlnLe -10	
TGTTTTCAATTTAGACTTGGATTCTCACTTGCATTTATCTTCAGCT	810
1	
uLeuLeuPheAsnProLeuValLysThrGluGlyIleCysArgAs	
GCTCCTATTTAATCCTCTCGTCAAACTGAAGGGATCTGCAGGAA	855
10 18	
nArgValThrAsnAsnValLysAspValThrLysLeu	
TCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCATAAATTGGTAAGTAA	900
GGAATGCTTTACCGTGCTGTGTAAAAAAGAGCTGTGGCTCTTTTT	945
CCTGTGCTTGTTGATAAAAGATTTAGATTTTTCTTGCCCCAAAGT	990
AATGTTTTCTTAAAGTGGGGAAAGTAATCACTGGGTTACAATAAA	1035
GGGTTTATAGAAAGCAGGTAGTGAGATATTTAGGGTCATGGATAA	1080
TTTGTGGTAAAACTGGCTAGTTGCACACCACTGCTGTGACTGCT	1125
TCTTTGCTGGTCTTCTCCCCATCCTTCATAGGCAGTGAAGGACCT	1170
TGGAGAGTTCGCTGTGTGCTGATGGGCTTGCCCCAGCTTGTTCCC	1215
CATAATCTCTCCAGTGGGTTTCCCAGCATGTTCTATTCCCCTTCA	1260
CATGTCTTCCTACTCTTCTTTAAAAAGCCTAACGAAAGGAAATCT	1305
GAAATGGCTATTCTCCCAATTCAATCAGCAGGAAGACCCTGTCAC	1350
ATGTCAGTGGGTGTTTGCTCCTTCAGGGAACATAGAGAGGTGATT	1395
CATTGCCACATGTTGAAGGGACTCATCTCCCTGGTTTGTCACAT	1440
TGAACTCTTCCTCAGCGAAAGCATTTGCATTGCTTCCC	1479

189

DSK

PU488-97

6024

Obr. 15B *pokrač.**Intervencijská sekvenca a porovnání délky*

GAATTCCAAGATCACAGGTGGAAGCTGAAATTCAGATCATGTTTC	45
CAAACTCAGTAGGTTATACCTAGCCAGGCATAACTGAATTTGGA	90
GTCTAAAAGATCTGTATTATCACTTTTTTATTTTGAAGGATGCCT	135
TTTGATTACAGAGGGAAATCAAGGATTAAAAATCAATATACATGT	180
AAATATTGAAATTCATTGGTAACTTTAAAAAGCACACAGTTTTG	225
TGTGCTTTTCTCCAAAGCACTACAAATATGATTAATTGATGTATA	270

19

ValAlaA

AGAATTTTCTTATGGAATTTTTTTTTTTTGTCTCTGTAGGTGGCAA	315
--	-----

30

snLeuProLysAspTyrMetIleThrLeuLysTyrValProGlyM	
ATCTTCCAAAAGACTACATGATAACCCTCAAATATGTCCCCGGGA	360

39

etAspValLeu

TGGATGTTTTGGTATGTAACTACATTTCTGAGTTTCATTTTAGT	405
AGCTCATAGAAGAAATGGGATCATTCATATTGAGATAGTACACTA	450
GCTGCTATTTAGGAGCTTGCTTATTGTCAGGATTTGAAGAATTTA	495
TCTTTGGAATTTGACTTGCAGGCTTTTTTTTCCCCCTCTT	535

Intervencijská sekvenca a porovnání délky

CCTGTTACAAGAGTCCCTCCTCCTATTACAATAGTCCCTCCTCCT	45
CCTGTCACACTAGTCCCTTCTCTTCCTGTTACAATAACCCCTGTC	90

Obr. 15B pokrač.

CTCCTATTACAACATTTTAAAGTAATGTAATATTAATTTTAAAAAT	135
CTGGCCAGGCACGGTGGTTCATGCTTGTAATCCCAGCACATTGGG	180
AAGCTGAGACGGGTGGATCATTTGAGGTCAGGAAGTTTGAGACAG	225
CCTGGCCAACATGGTGAACTTCCTCTCTACTAAAAATAAAAAAG	270
TAGCCAGGCATGGTGGCAGGCACTTGTAATCTGAGCTACTCGAGA	315
GGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAGTAACTAAAACGATAGCTTTG	360
AAGAGTACTCCGAGTTTTATGGCACTTACTTATTAAAATAGCTGT	405
40	
ProSerHisCysTrpIleS	
TTTGTCTCTTTTTTCATATCTTGCAGCCAAGTCATTGTTGGATAA	450
50	60
erGluMetValValGlnLeuSerAspSerLeuThrAspLeuLeuA	
GCGAGATGGTAGTACAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGG	495
70	
spLysPheSerAsnIleSerGluGlyLeuSerAsnTyrSerIleI	
ACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCA	540
80	90
leAspLysLeuValAsnIleValAspAspLeuValGluCysValL	
TAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCGTGA	585
96	
ysGluAsnSerSerLys	
AAGAAACTCATCTAAGGTAACCTTTGTGTTTCATTGGGATTATTTT	630
TCATTACGCTTCTCTAAAAACCCATGCTTCTTGGTGCTGTTGGGG	675
AAAATGAGGCACCTTTATTTATGATATTTTGATTGTATAAACTTC	720
AAATTTAAAAATCTTGTTTCAGATGAGCAAAGAAAACAAGTATTTG	765
CAGTTATACTGCAATACTGAAGTGCACATTC	796

183

715K PV488-94 60247

Obr. 15B *pokrovi**Intervencijska sekvenca o uvođenju delice*

TTGTGTTCACTGCCCCAGATTCAACTTGTGATCCCACTGGGATCA	45
CTACCCTGCATTACCAATCTGAATTACATACGTTAAACAGCCAT	90
CTAAAAGTGCTAGTTGTAAGAGTCTAAATACTTGAATCTTTGAGA	135
GACATATTTATAGTCCATTATCTTCACCTCAGTTAAGTCTGAAGA	180
	97
CTATTTGAAAAATGTAATCCTATTTTTTCTTCTAGGATCTAAAAA	225
	110
ysSerPheLysSerProGluProArgLeuPheThrProGluGluP	
AATCATTCAAGAGCCCAGAACCCAGGCTCTTTACTCCTGAAGAAT	270
	120
hePheArgIlePheAsnArgSerIleAspAlaPheLysAspPheV	130
TCTTTAGAATTTTAAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTG	315
	140
alValAlaSerGluThrSerAspCysValValSerSerThrLeuS	
TAGTGGCATCTGAAACTAGTGATTGTGTGGTTTCTTCAACATTAA	360
	148
erProGluLysA	
GTCCTGAGAAAGGTAAGACATGTAAGCATTTCAGTTCAAATGTA	405
AACAACAACTTAAATCTTCCCTATGTAGTAAGAATCTACCTCTG	450
TGTTAAGCTGTAGCAAGATACATGCATGTACGTCTAATAAAAAAG	495
CAGATATCAATAGCACAGAAGAAA	519

184 . TISK PU988-9.7.

~~60047~~

Obr. 15B pokrač. 5
ukvapených' sekvena o učením' delce

CTCTATAACTCATACAAATCACCATATAACACTGACACATTATTG 45

150 160
spSerArgValSerValThrLysProPheMetL
CTTTCTATTTAGATTCCAGAGTCAGTGTCAAAAACCATTTATGT 90

170
euProProValAlaAlaSerSerLeuArgAsnAspSerSerSerS
TACCCCTGTTGCAGCCAGCTCCCTTAGGAATGACAGCAGTAGCA 135

176
erAsnA
GTAATAGTAAGTACATATATCTGATTTAATGCATGCATGGCTCCA 180

ATTAGCACCTATAGGAGTATTGCATGGGCTTTCAAGGAACTTCT 225

ACATTTATTATTATTGATACTGTTCTGTTACTGTTATTCCTTTTA 270

TGGTCTTCTTGAGACTTAAGTTTGTAGAATTAAATTTCCCTAGAG 315

CTGGAGATAATGTTTGTAGAGAATTAGGCCAATAAATTT 352

Obr. 15C

-25

-20

AAGCTTGCCTTTCCTTATGAAGAAGACACAAACTTGGATTCTCACTTGCATTATCTTCAG 61
M K K T Q T W I L T C I Y L Q

-10

L L L F N P L V K T E G I C R N R V T N 10
CTGCTCCTATTATCCTCTCGTCAAAACTGAAGGGATCTGCAGGAATCGTGTGACTAAT 121
1

20

N V K D V T K L V A N L P K D Y M I T L 30
AATGTAAAGACGTCACTAAATTGGTGGCAATCTTCCAAAGACTACATGATAACCCCTC 181

40

K Y V P G M D V L P S H C W I S E M V V 50
AAATATGTCCCGGATGGATGTTTGGCCAAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTA 241

60

Q L S D S L T D L L D K F S N I S E G L 70
CAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGGACAAGTTTCAAAATATTCTGAAGGCTTG 301

80

S N Y S I I D K L V N I V D D L V E C V 90
AGTAATTATTCATCATAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCCTG 361

100

K E N S S K D L K K S F K S P E P R L F 110
AAAGAAACTCATCTAAGGATCTAAATAATCATCAAGAGCCCAACCCAGGCTCTTT 421

185

77SK

PV 488-97 60247

Obr. 15C *polnec*.

T P E E F F R I F N R S I D A F K D F V 130
 ACTCCTGAAGAAATCTTTAGAAATTTTAATAGATCCATTGATGCCCTTCAAGGACTTTGTA 481

 V A S E T S D C V V S S T L S P E K D S 150
 GTGGCATCTGAAGACTAGTGATTGTGGTTTCTTCAACATTAAGTCCTGAGAAAGATTCC 541

 R V S V T K P F M L P P V A A S S L R N 170
 AGAGTCAGTGTCACAAACCATTTATGTGTACCCCTGTTGCAGCCAGCTCCCTTAGGAAT 601

 D S S S S N S K Y I Y L I 183
 GACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACATATACTGATTTAATGCATGGCTCCAAT 661
 TAGCACCTATAGGAGTATTGCATGGGCTTTCAAGGAACTTCTACATTTATTATTATGA 721
 TACTGTTCTGTACTGTATTCCCTTTTATGGTCTTCTTGAGACTTAAGTTTGTAGAAATTA 781
 AATTTCCCTAGAGCTGGAGATAAATGTTTAGAGAAATTAGG 820

185

DSK

PV 488-97

60247

Obr. 16A

-25

1
 MKKTQTWILT CIYLQLLLEN PLVKTEGICR NRVTNNVKDV TKLVANLPKD 25
 MKKTQTWILT CIYLQLLLEN PLVKTEGICR NRVTNNVKDV TKLVANLPKD
 MKKTQTWIIIT CIYLQLLLEN PLVKTGICG KRVTDnVKDV TKLVANLPKD
 MKKTQTWIIIT CIYLQLLLEN PLVKTKEICG NPVTDNVKDI TKLVANLPND
 MKKTQTWIIIT CIYLQLLLEN PLVKTQEICR NPVTDNVKDI TKLVANLPND
 MKKTQTWIIIT CIYLQLLLEN PLVKT.gICr nRVTDnVKDV TKLVANLPKD

75
 YMITLKYVPG MDVLP SHCWI SEMVQQLSDS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 YMITLKYVPG MDVLP SHCWI SEMVQQLSDS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 YKIALKYVPG MDVLP SHCWI SVMVEQLSVS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 YMITLNYVAG MDVLP SHCWL RDMVIQLSLS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 YMITLNYVAG MDVLP SHCWL RDMVTHLSVS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 YmItLkYVpG MDVLP SHCWi s.MVvqLS.S LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI

125
 IDKLVNIVDD LVECVKENSS KDLKKSFKSP EPRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 IDKLVNIVDD LVECVKENSS KDLKKSFKSP EPRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 IDKLVKIVDD LVECTEGYSF ENVKAPKSP ELRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 IDKLGIIVDD LVLMEENAP KNIKESPKRP ETRSFTPEEF FSIFNRSIDA
 IDKLGIIVDD LVACMEENAP KNVKESLKKP ETRNFTPEEF FSIFNRSIDA
 IDKLvkivDD LveC.eens. kn.Kks.Ksp E.RlFTPEEF FRIFNRSIDA

184

DISK

PV488-94

60247

Obr.16B

174
FKDF.VVASE TSDCVVSSTL SPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
FKDF.AVASE TSDCVVSSTL SPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
FKDLETASK SSECVVVSSTL SPDKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
FKDF.MVASD TSDCVLSSTL GPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
FKDF.MVASD TSDCVLSSTL GPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
FKDF.mVAS. tSDCVVSSTL SPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS

224
SNRKAKNPPG DSSLHWAAMA LPALFSLIIG FAFGALYWKK ROPSLTRAVE

SN
SNRKASNSIG DSNLQWAAMA LPAFFSLVIG FAFGALYWKK KQPNL
SN
SN
SNRKA.N..G DS.L.WAAMA LPA.FSL.IG FAFGALYWKK .QP.L

248
NIQINEEDNE ISMLQEKERE FOEV

188

DISK

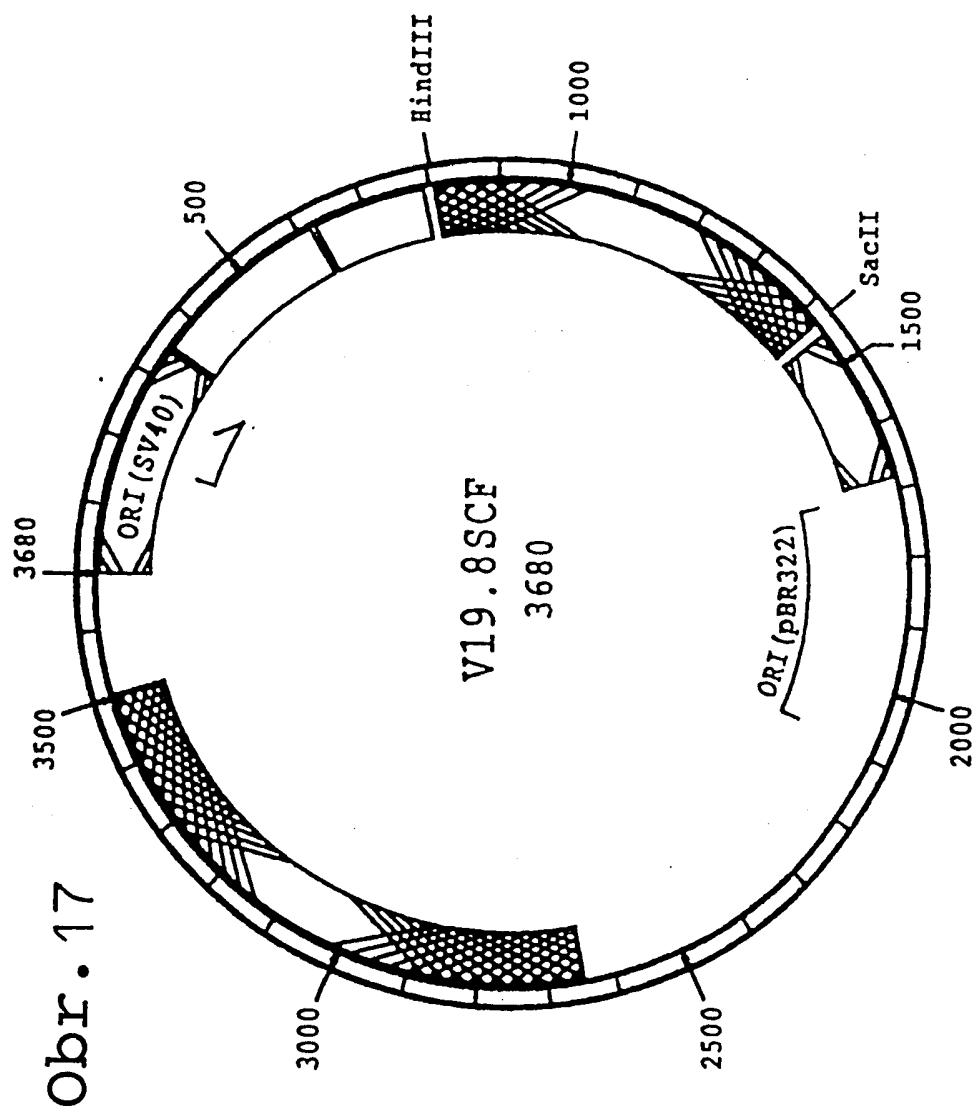
PV 988-97

60297

189

TRISK PU 488-94

6004

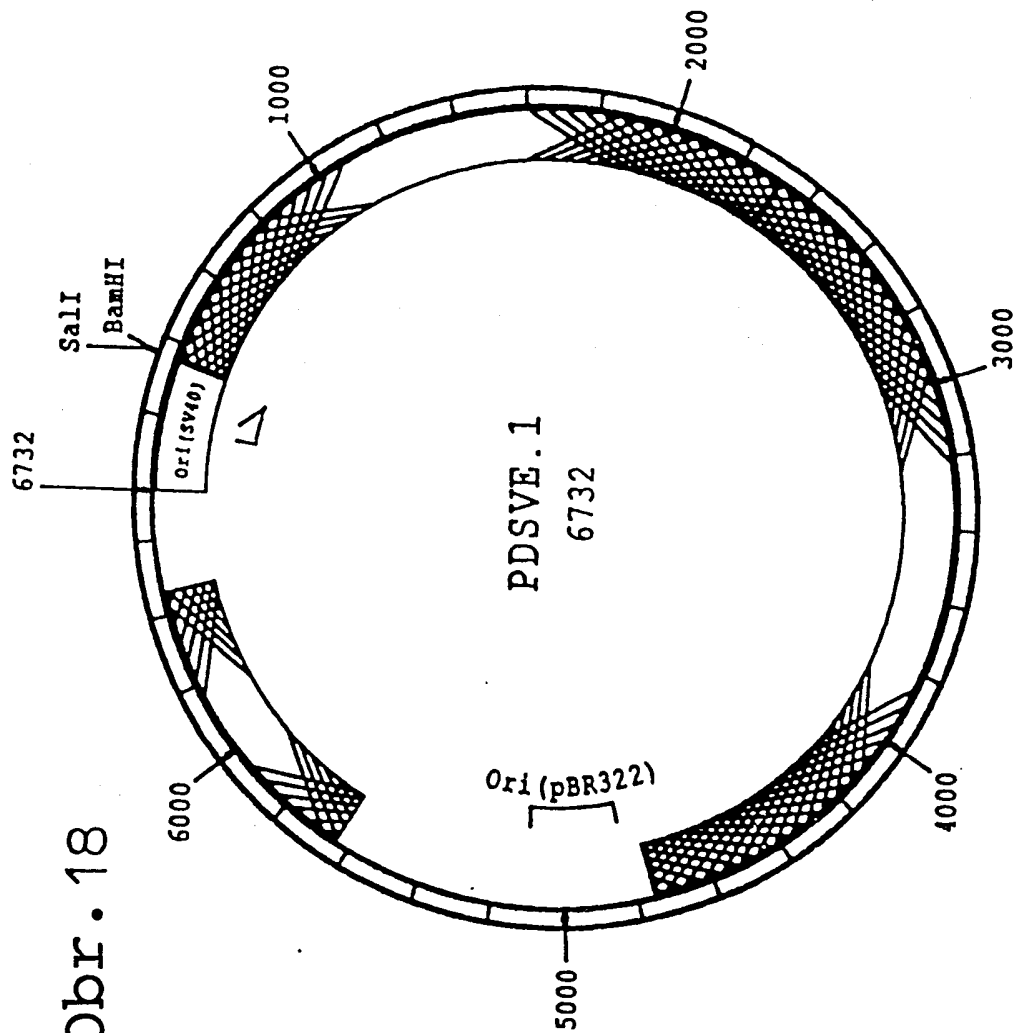


190

DSK

PV 488-97

60247

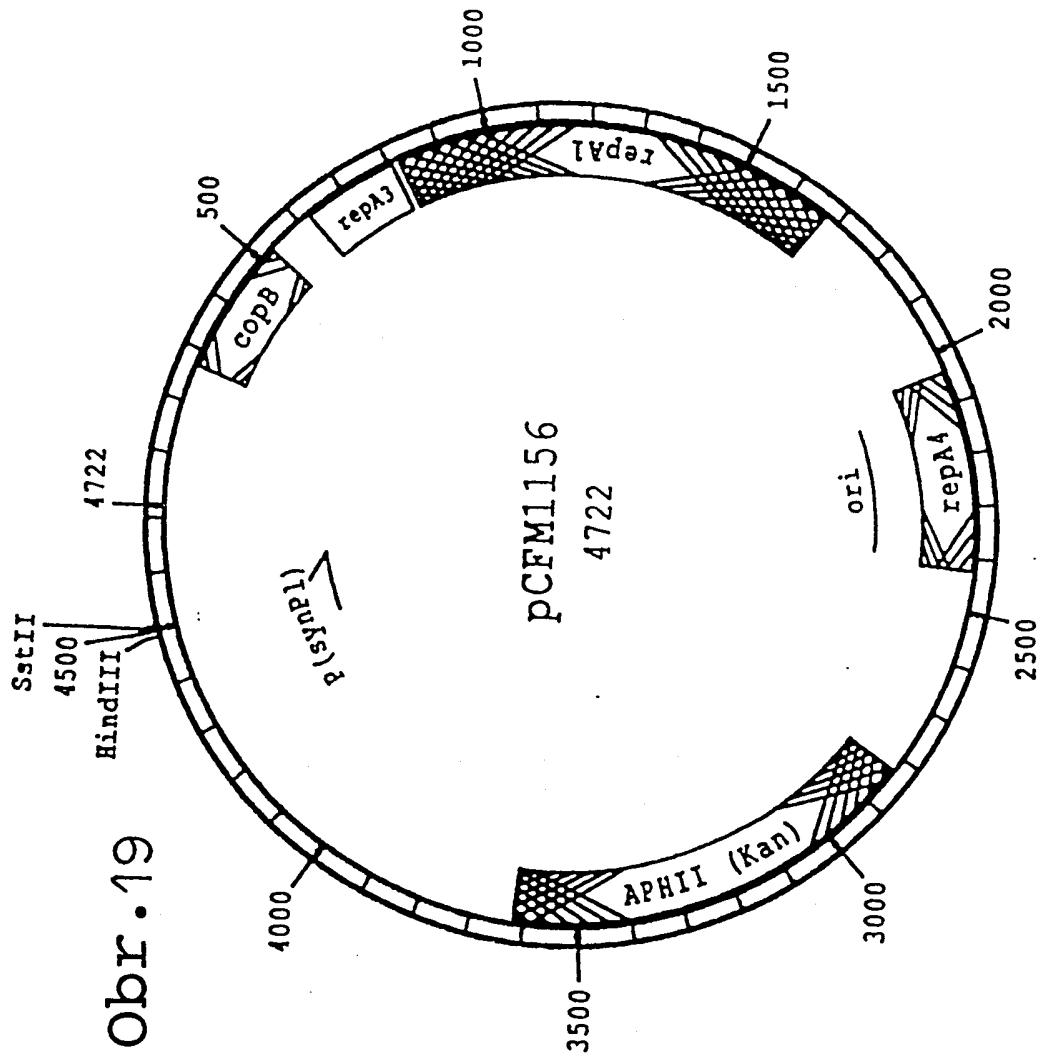


Obr. 18

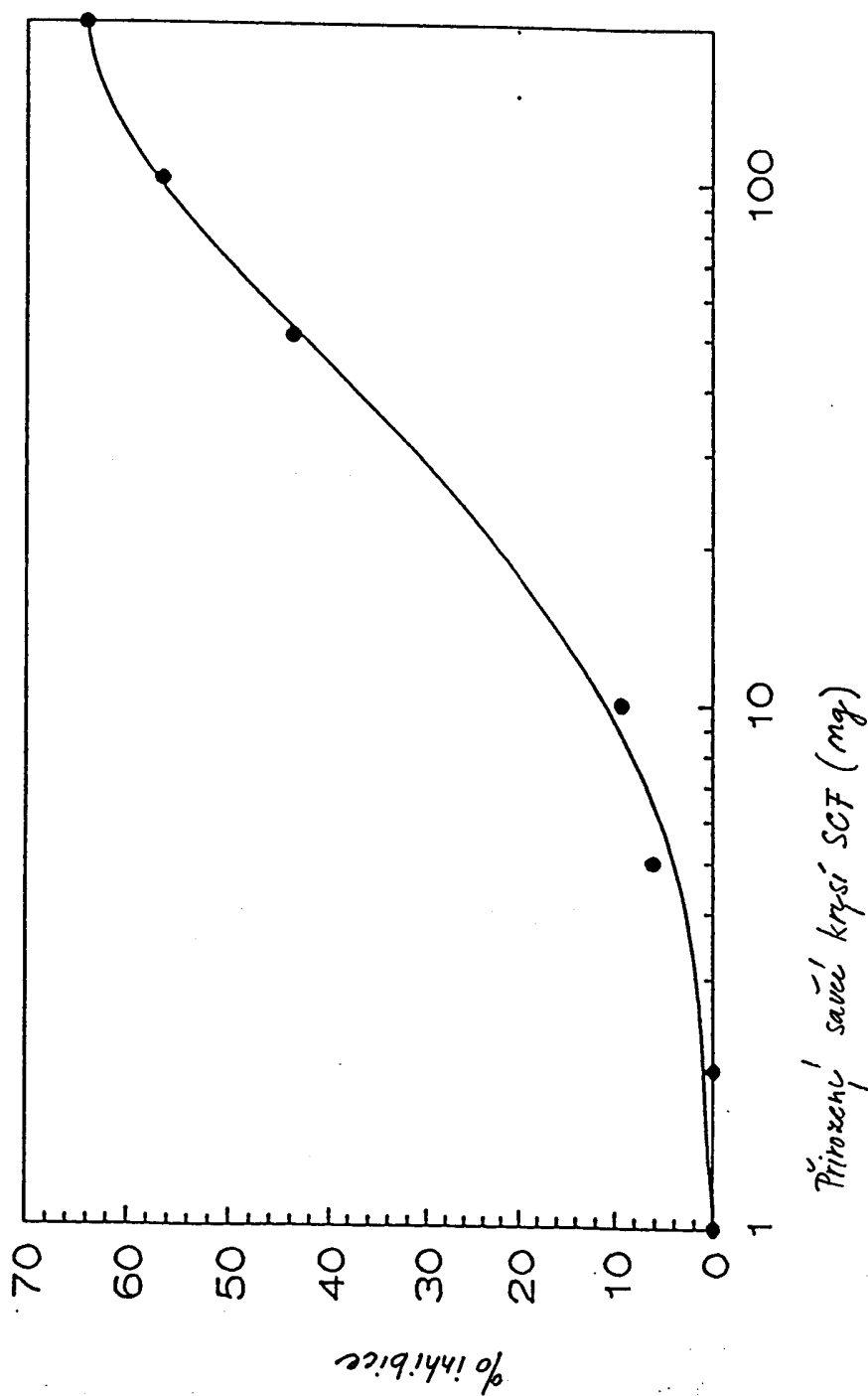
TASK PV 488-97

799

60247



Obr. 20A



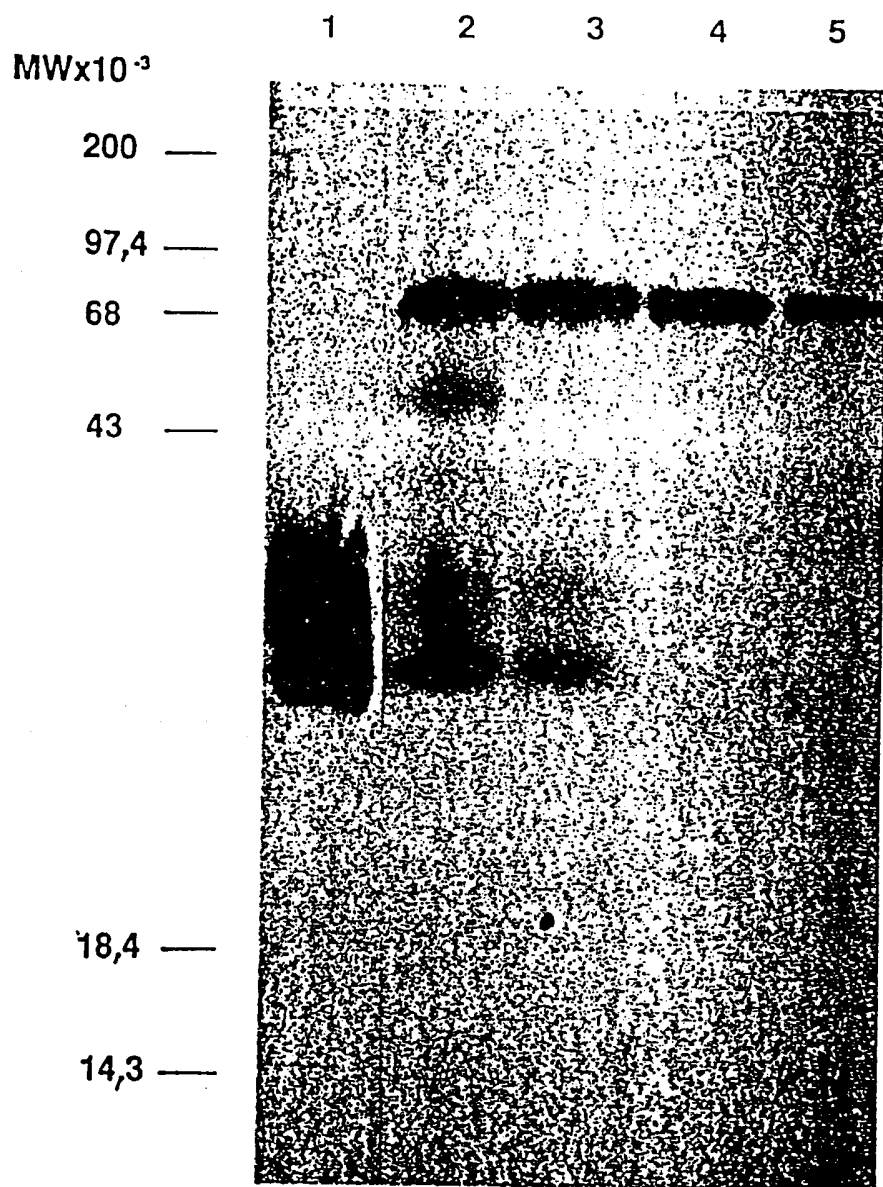
193

TISK

PV 488-94

60247

Obr. 20B

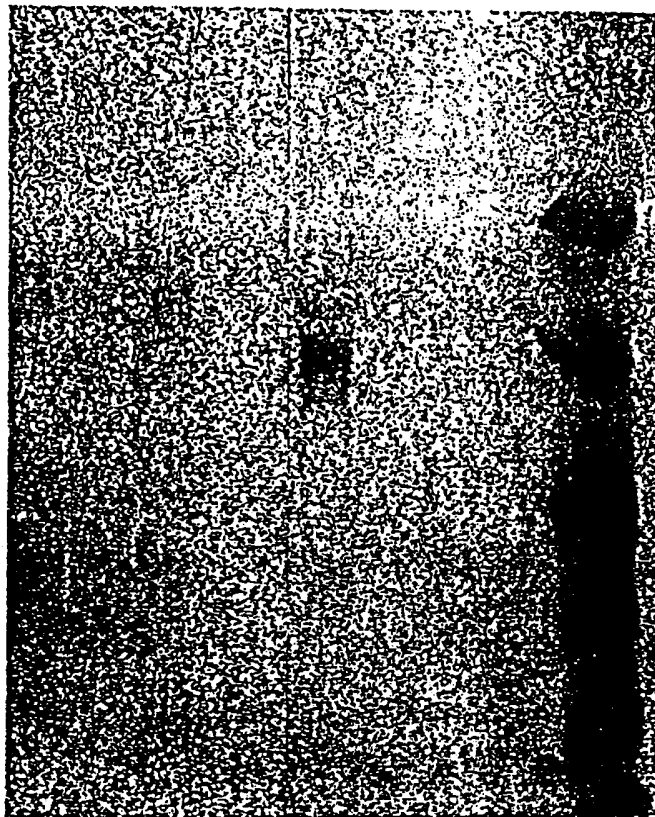


194 DSIK PV488-97

6000

Obr. 21

1 2 3 4 5 6 7 8 MWx10⁻³



— 43

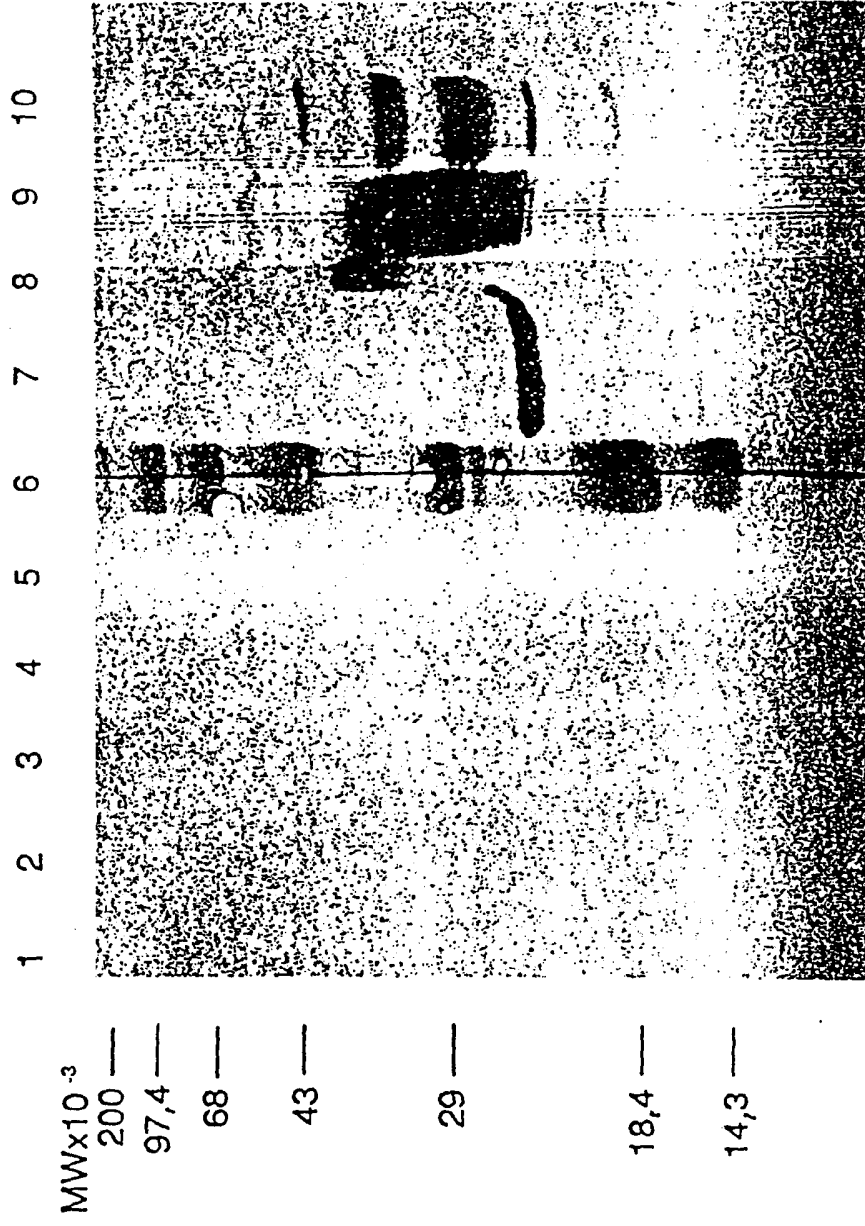
— 29

— 18,4

— 14,3

— 6.2

Obr. 22



195

---TISK PV 488-94 60277

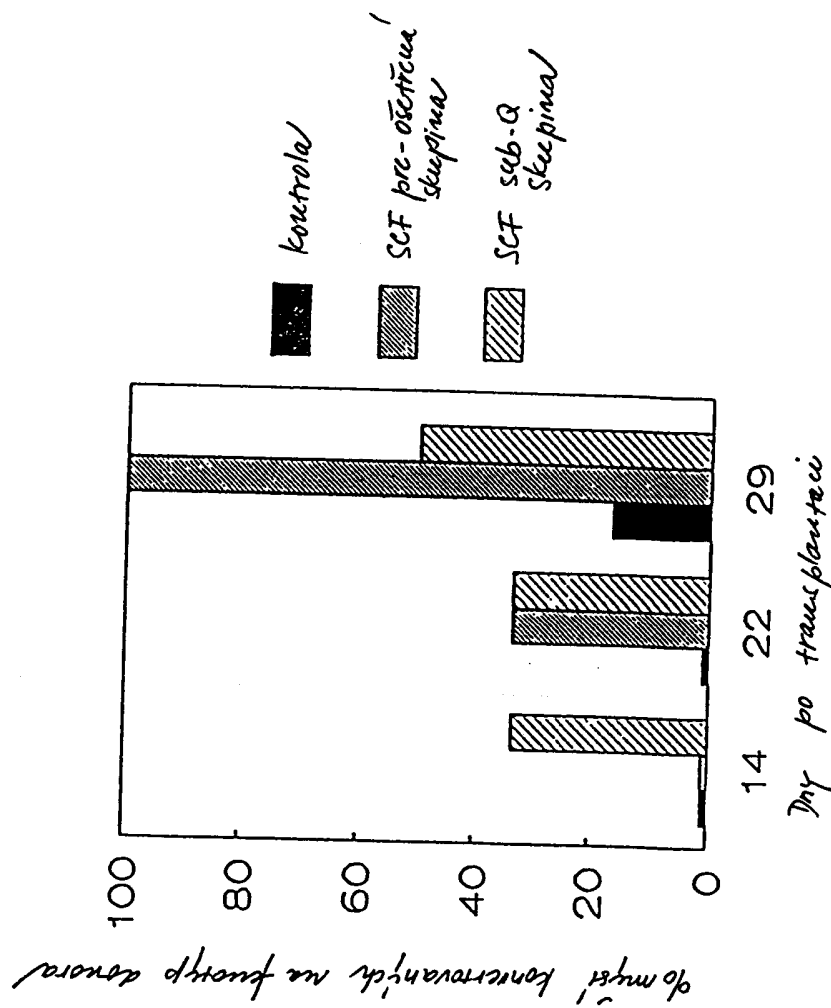
196

TISK

3V 488-97

60247

Obr. 23



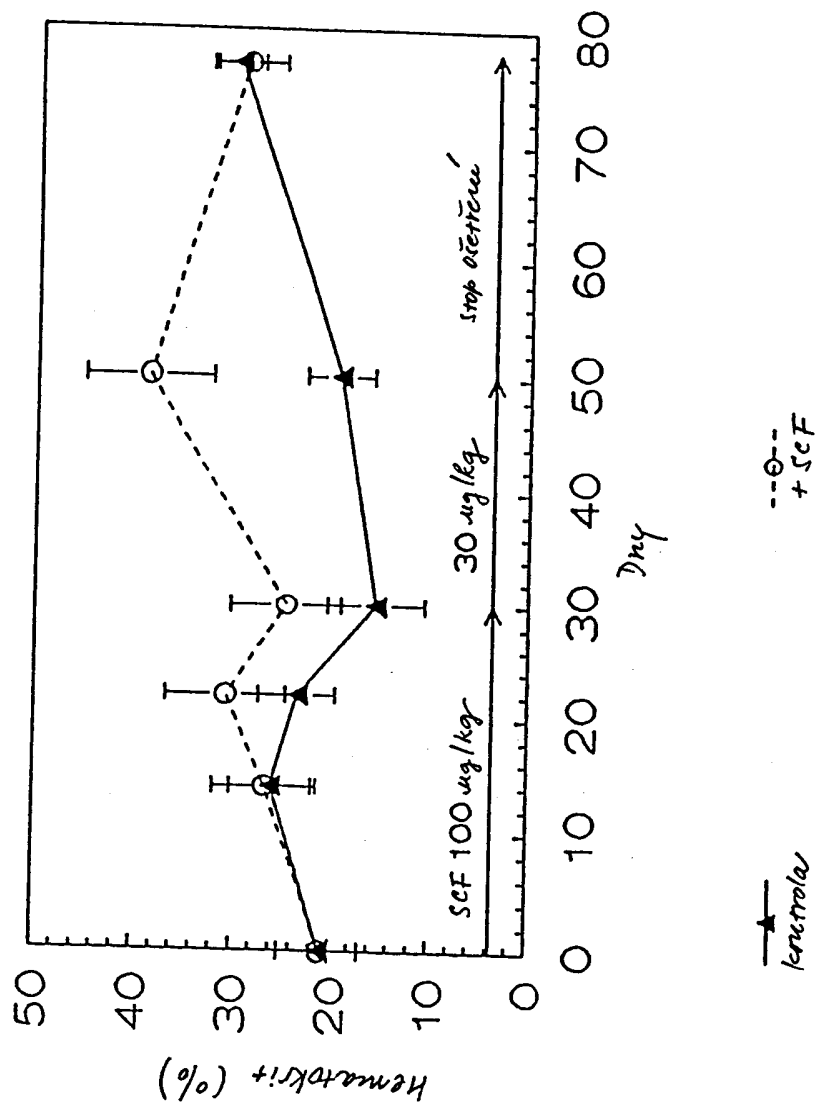
197

TISK

7V488-97

6027

Obr. 24 A



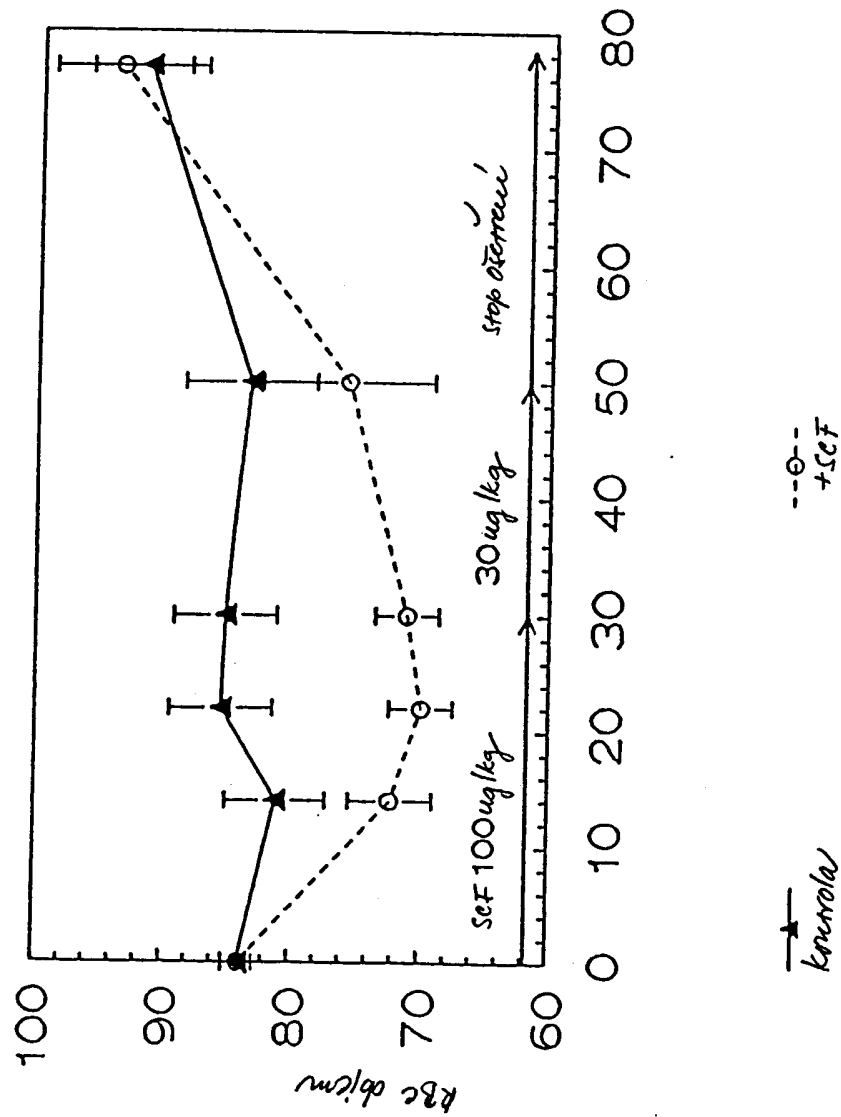
198

TISK

PV488-97

60277

Obr. 24 B

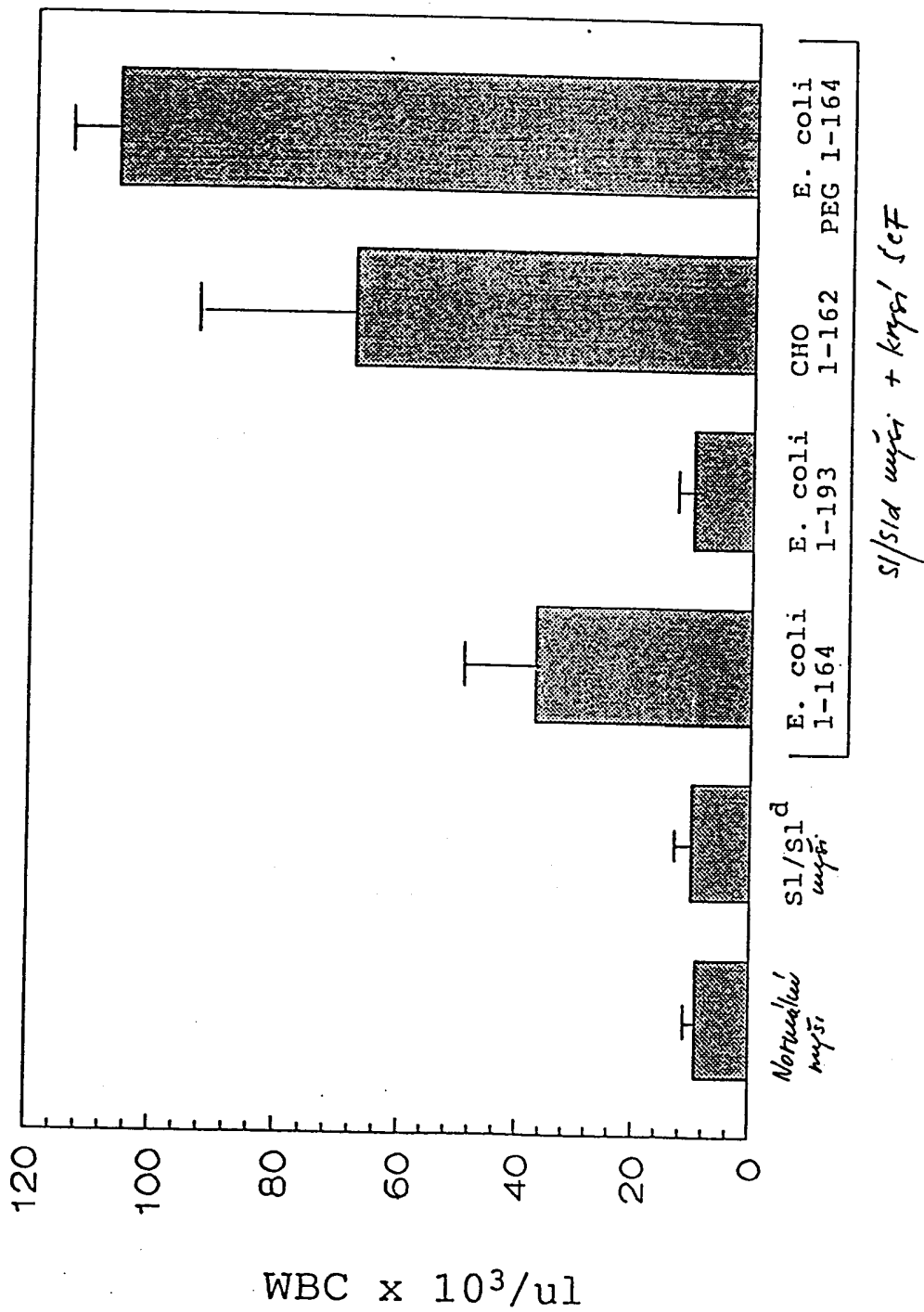


199

TISK PU 488-94

~~6024~~

Obr. 25

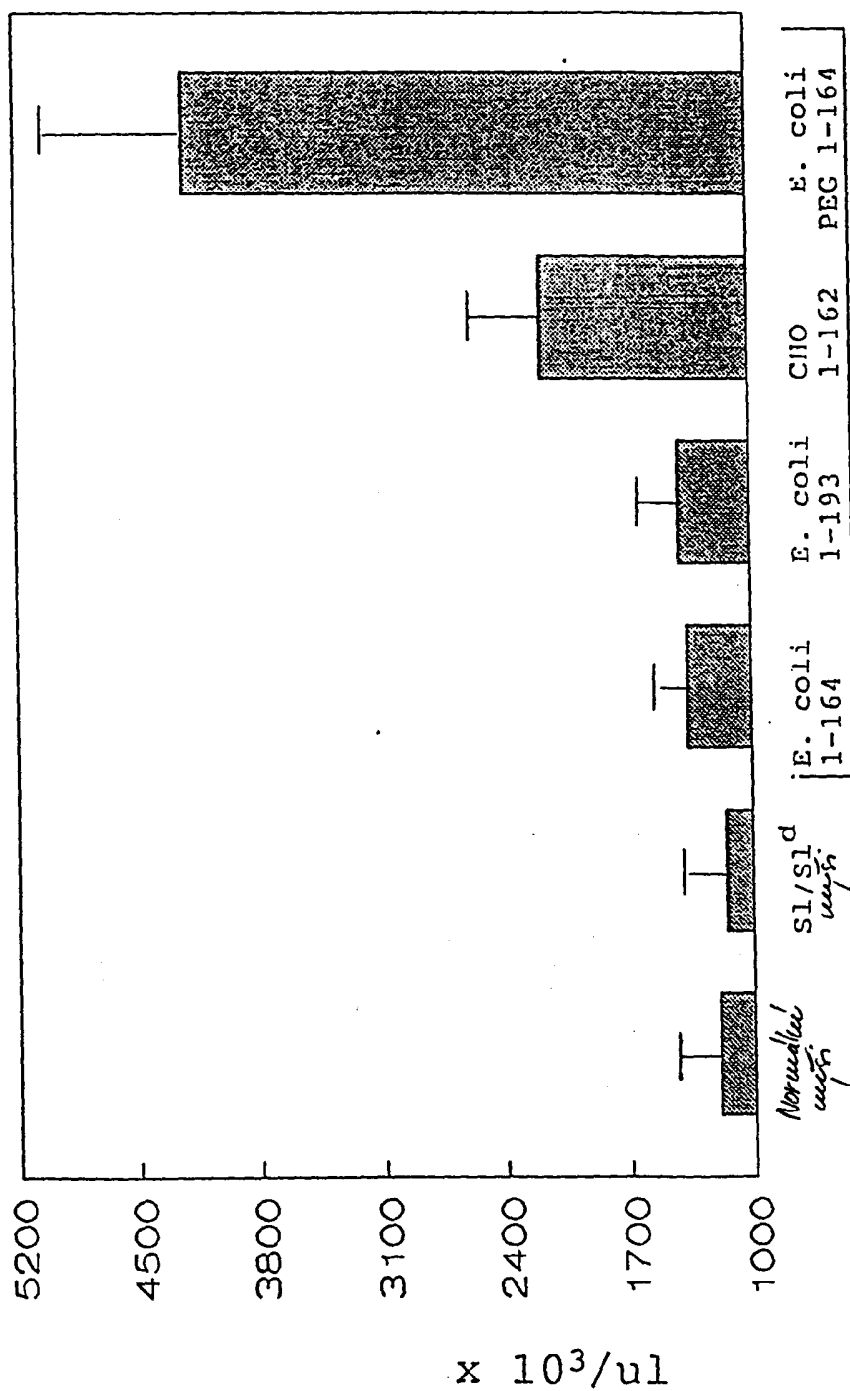


R-0

TSK

PV488-97 6047

Obr. 26



SI/SLd water + kryptofact

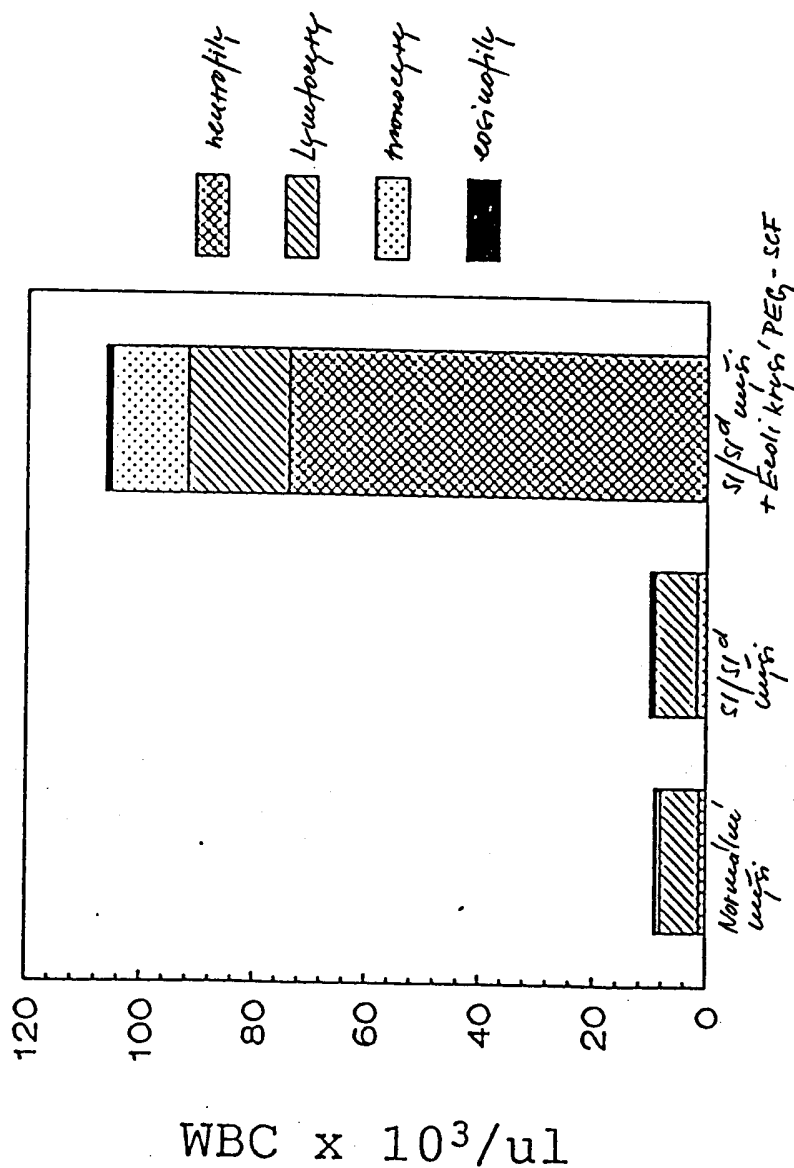
201

DISK

PV 488-97

60247

Obr. 27



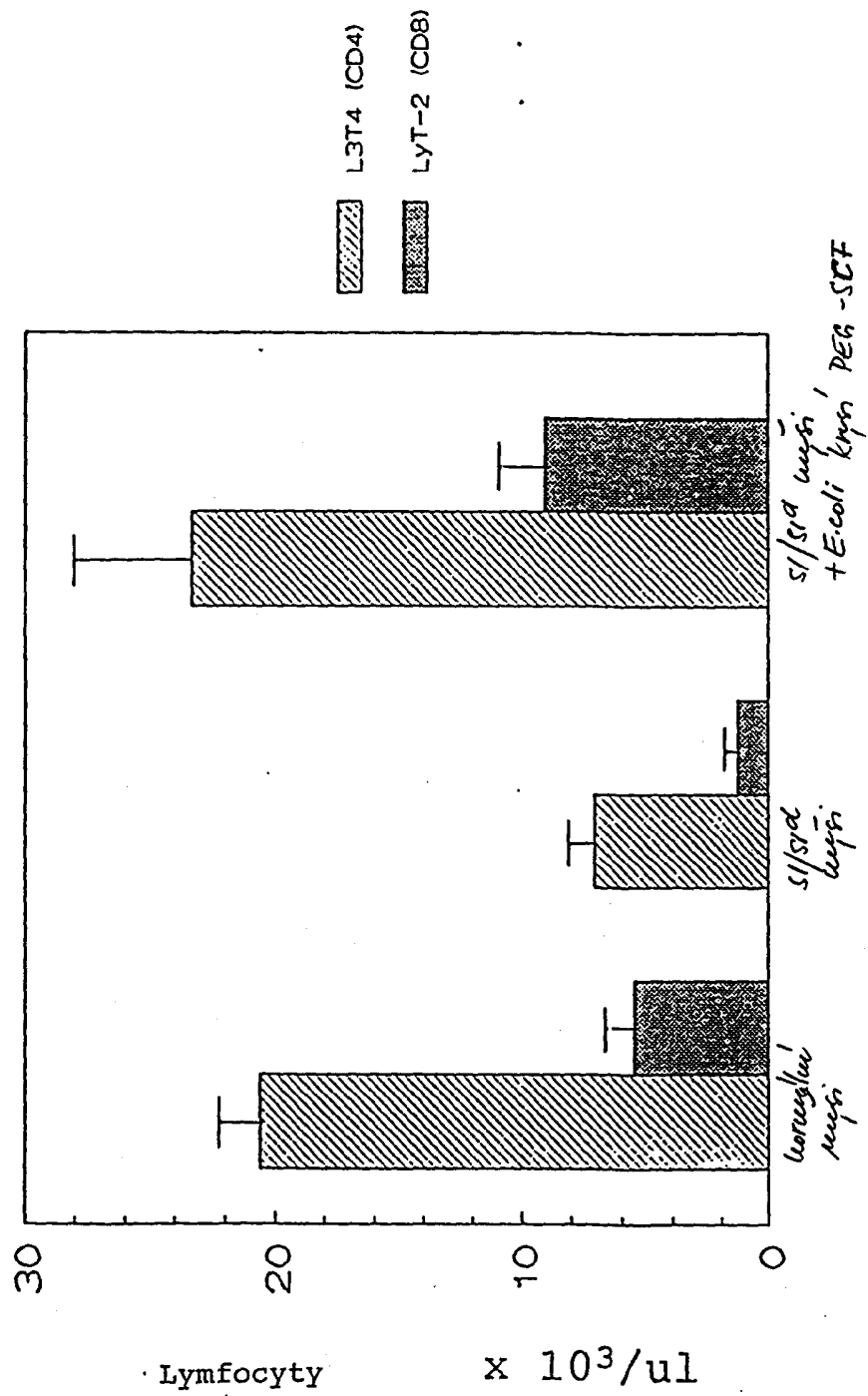
202

TISK

PV488-94

60677

Obr. 28



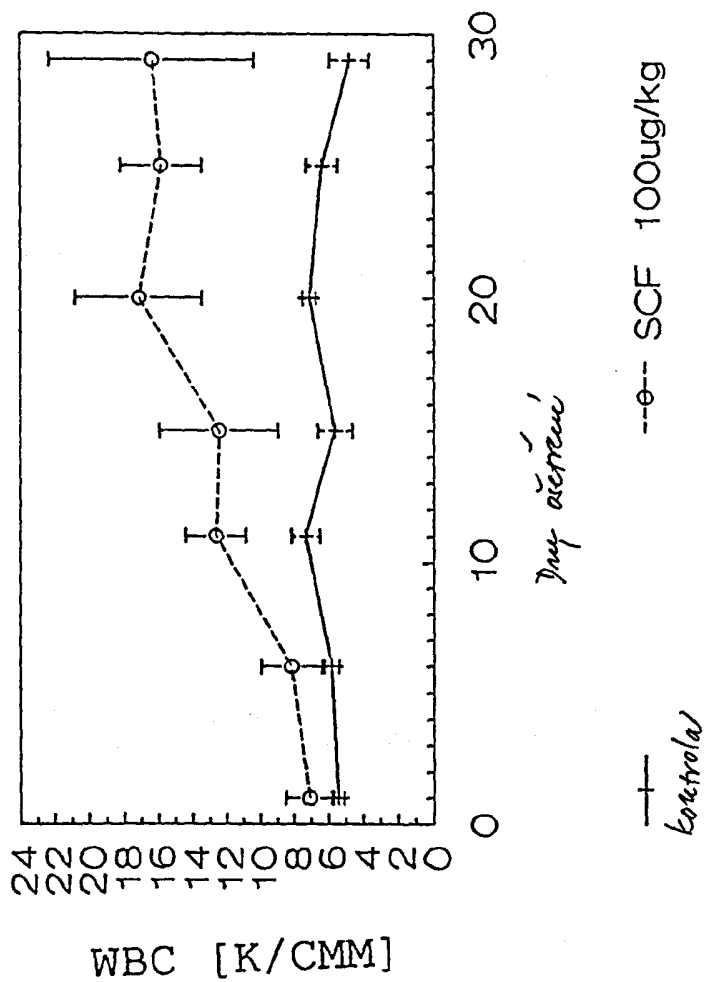
203

TISK

PV488-97

60247

Obr. 29 A



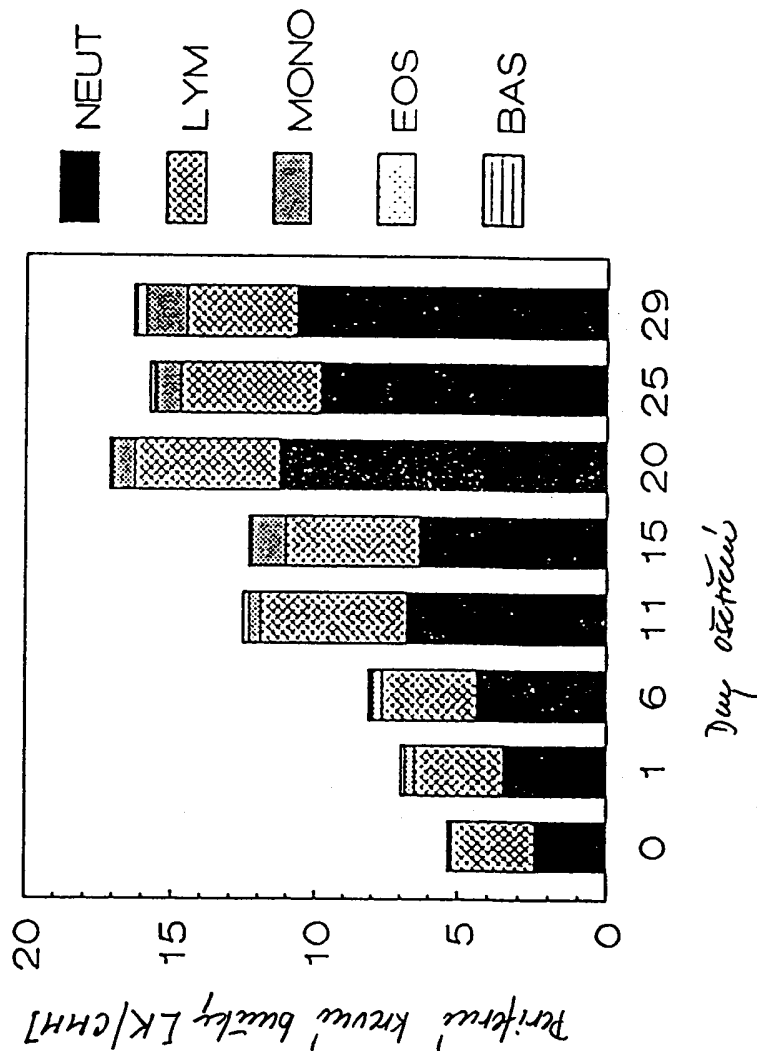
204

T7SIC

PV488-97

60247

Obr. 29B



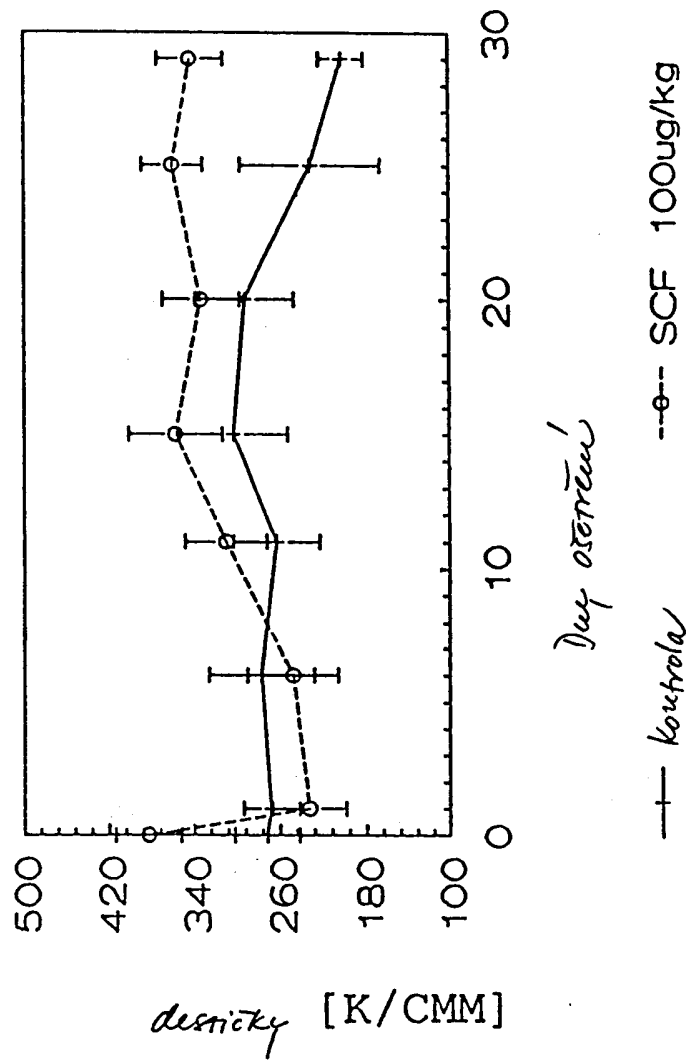
205

TISK

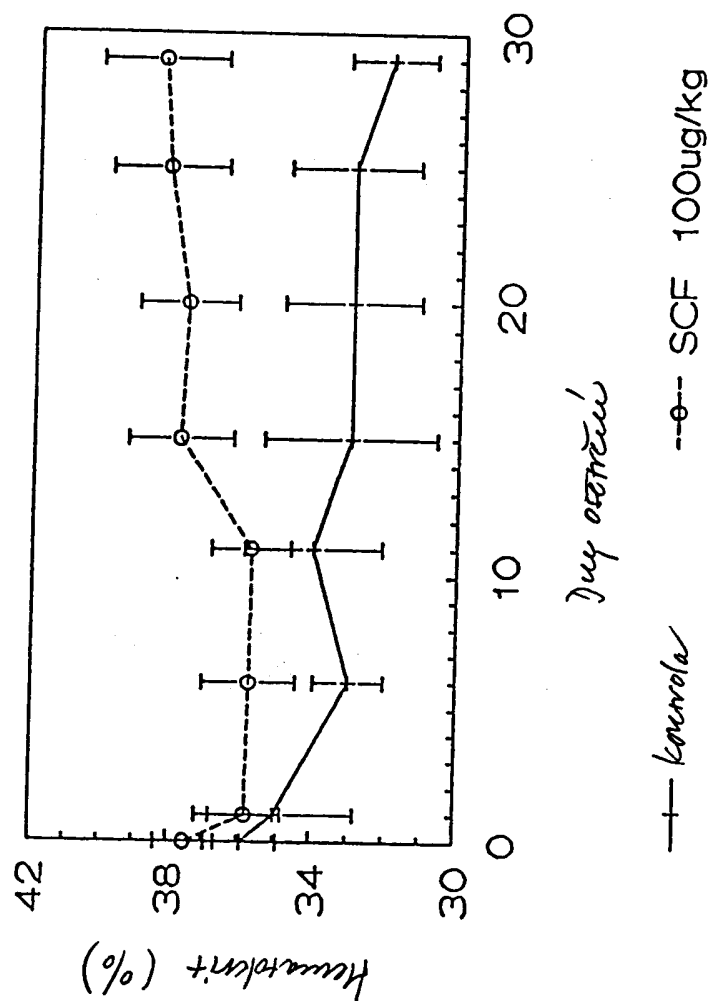
PV 488-97

60077

Obr. 30A



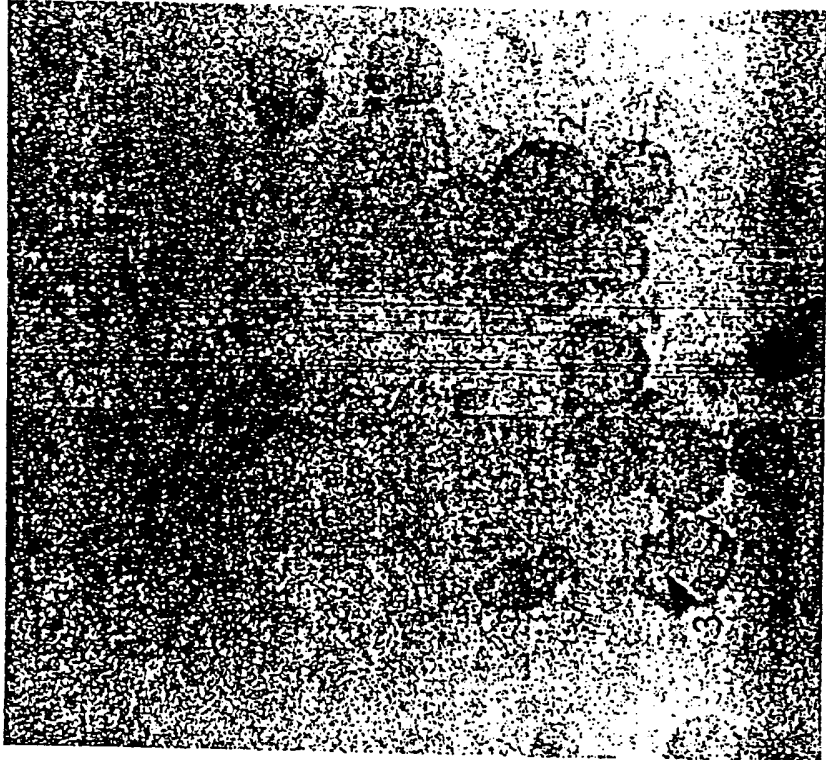
Obr. 30B



Obr. 31A



Obr. 31B



TSK

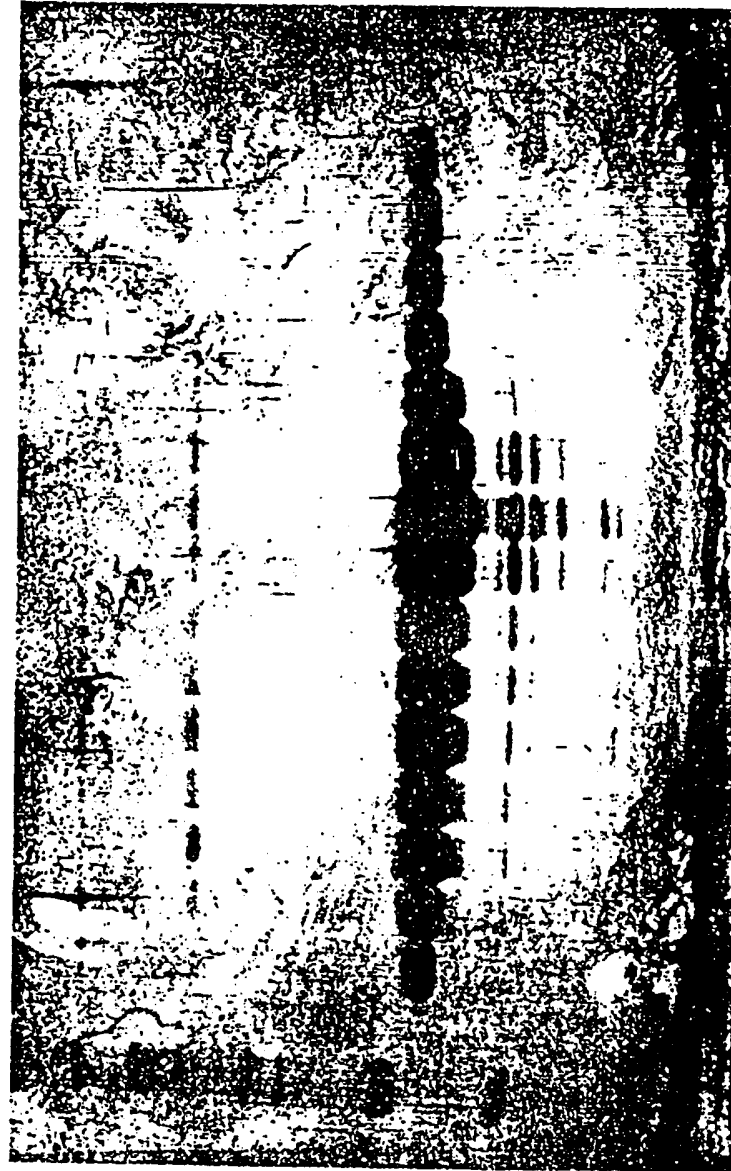
PV 988-97

60277

Separate Load

Obr. 32A

11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37



97.4 —
66.2 —
42.7 —
31.1 —
21.5 —
14.4 —

~~198~~ 208 TISK

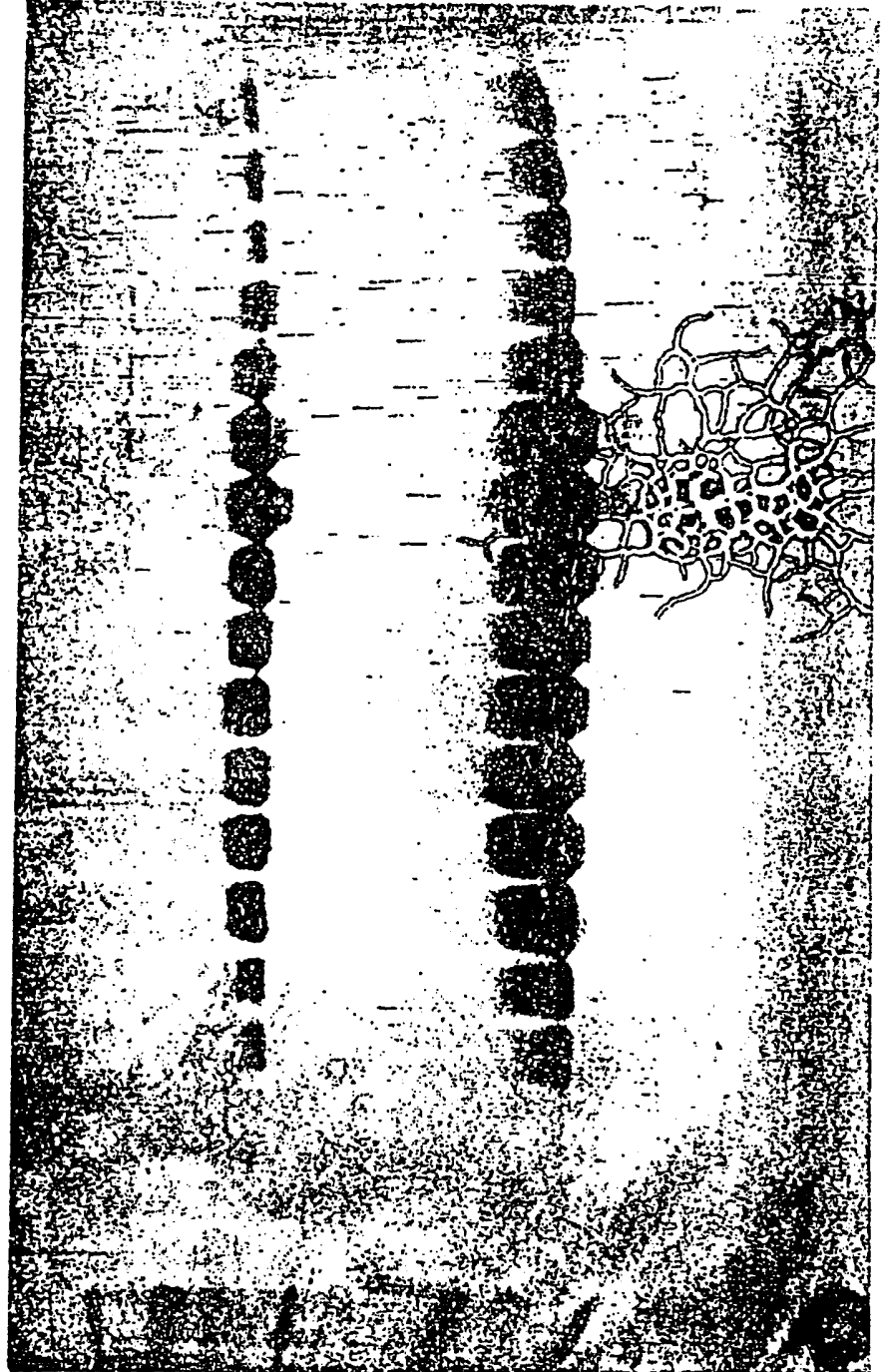
PV488-97

~~6047~~

Obr. 32 B

S. Sephanus Load

11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37



97,4 —
66,2 —
42,7 —
31,1 —
21,5 —
14,4 —

209

775K

PV488-97

~~60077~~

775K

410

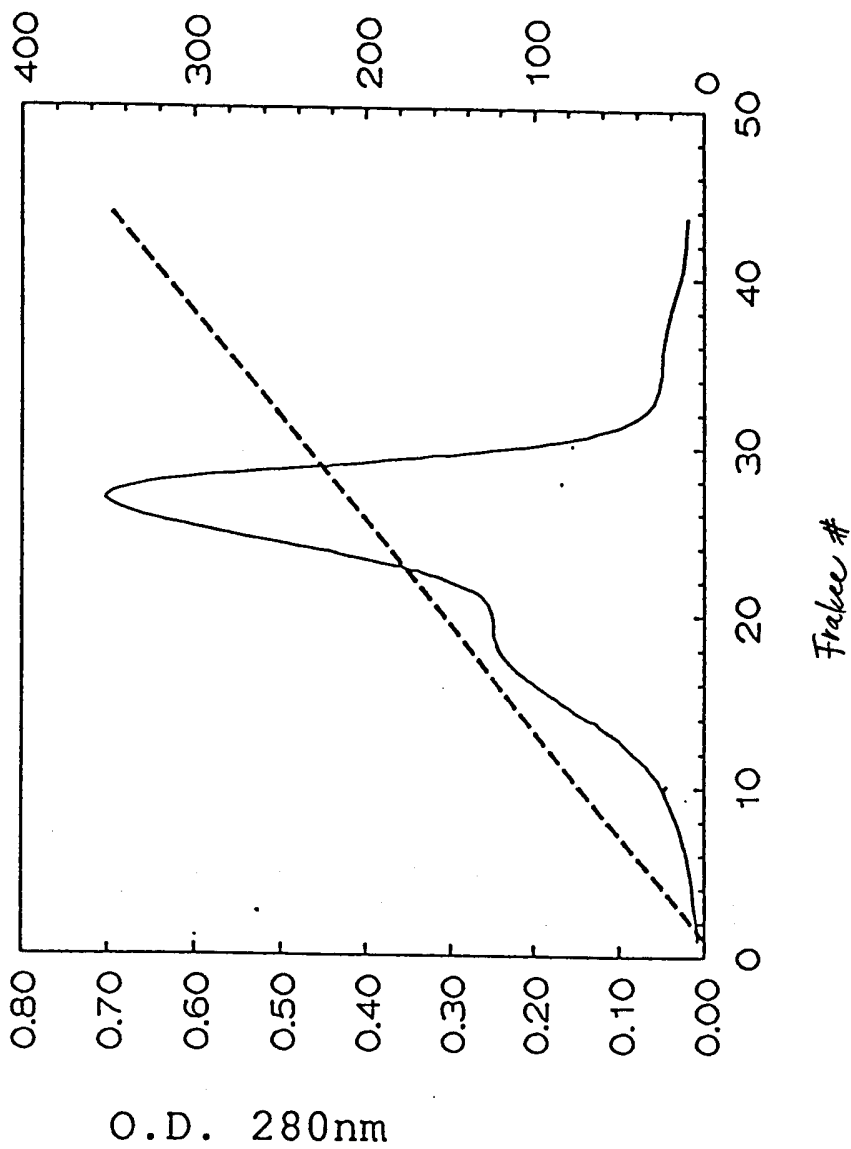
ISK

PV 488-97

~~60047~~

Obr. 33

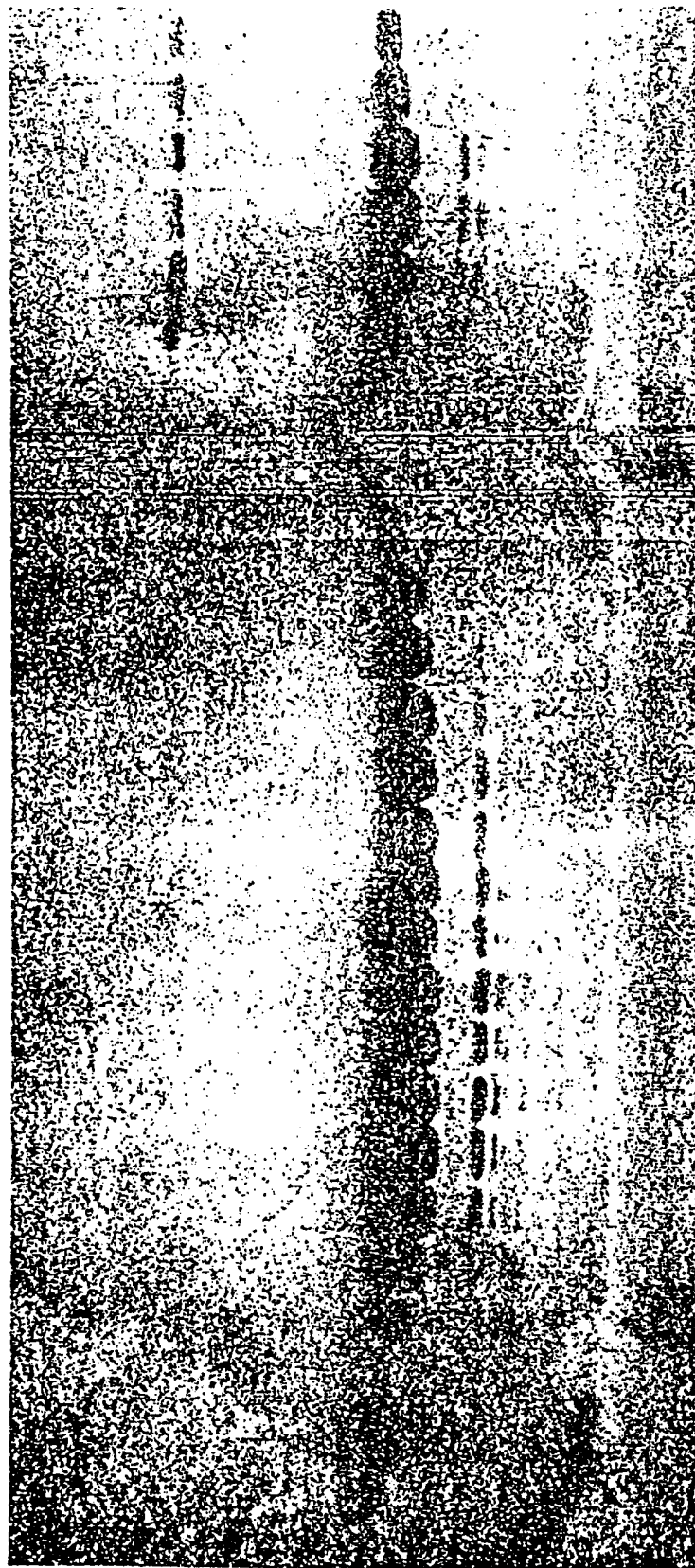
NaCl (mM) -----



Obr. 34A

S Separate Pool
CA Load
CA Flow Thru

	62	76	83	90	97	104	111	118	125	132	146	153	160	181	201	211	216	221	231
S Separate Pool																			
CA Load																			
CA Flow Thru																			



97,4 —
66,2 —
42,7 —
31,1 —
21,5 —
14,4 —

241

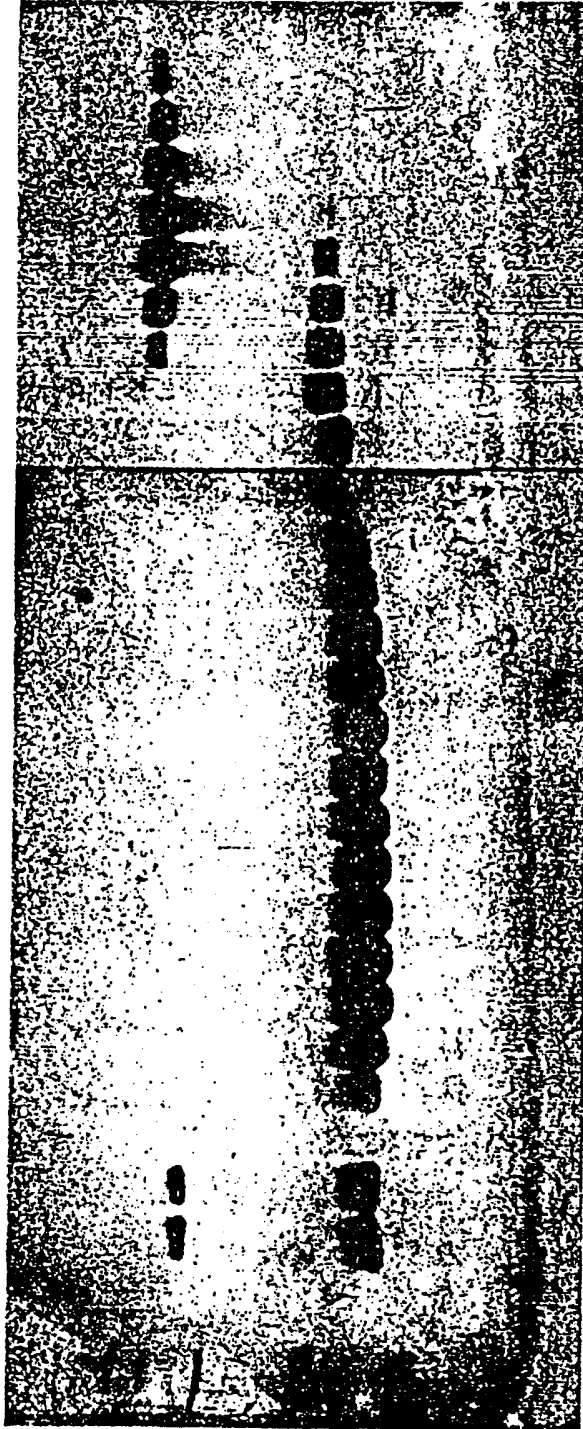
1100-11

75K
PV 488-97
6047

S. Sepharose Pool
C4 Load
C4 Flow thru

62 76 90 104 118 125 132 146 160 181 201 211 221 231
69 83 97 111 125 139 153 206 216 226

97,4 —
66,2 —
42,7 —
31,1 —
21,5 —
14,4 —



Obr. 34B

212 7751C PV488-94
60247

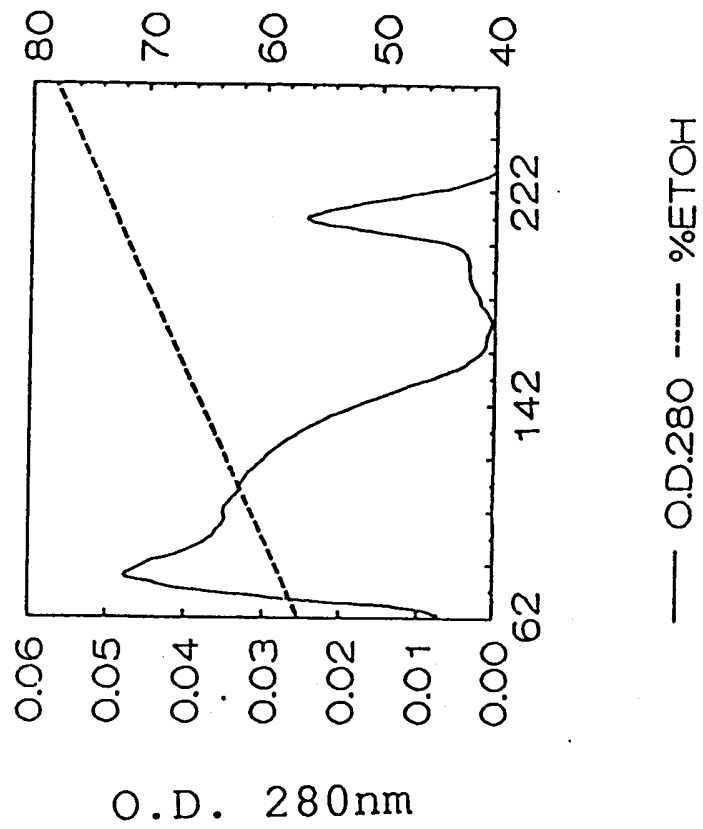
213

T7S1C

PV488-94

~~60247~~

Obr. 35



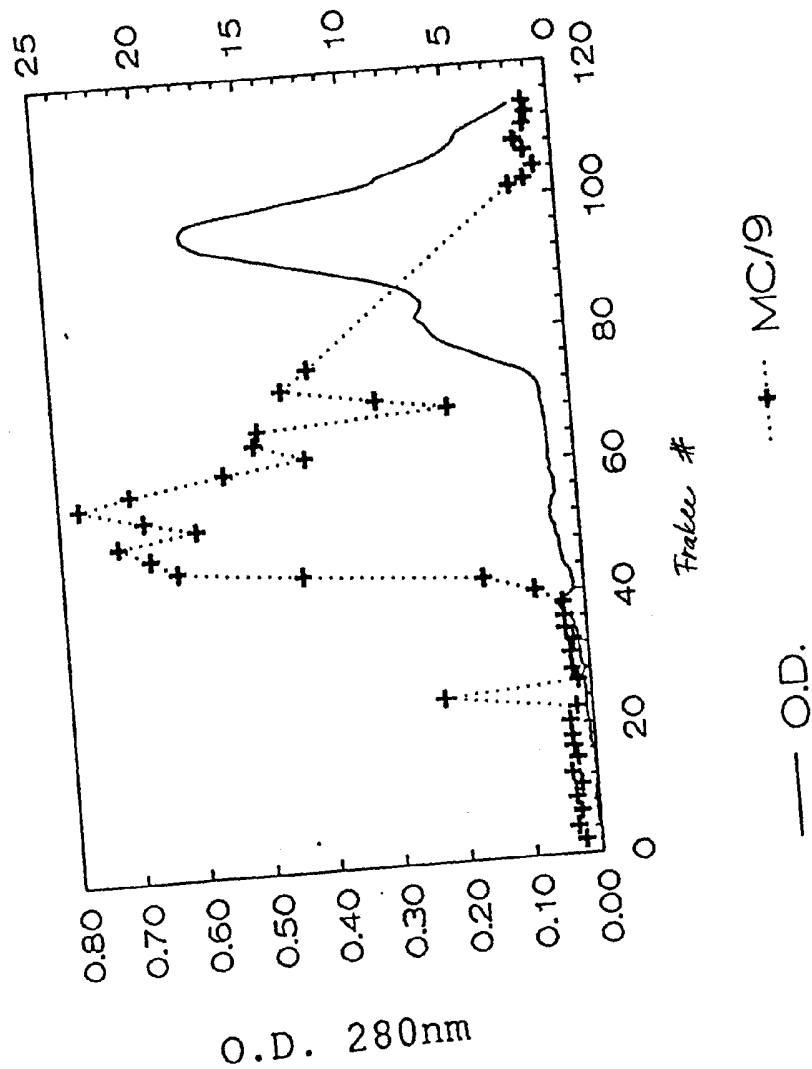
214 TISK

PV 488-97

60241

Obr. 36

MC/9 CPM ($\times 10^{-3}$)



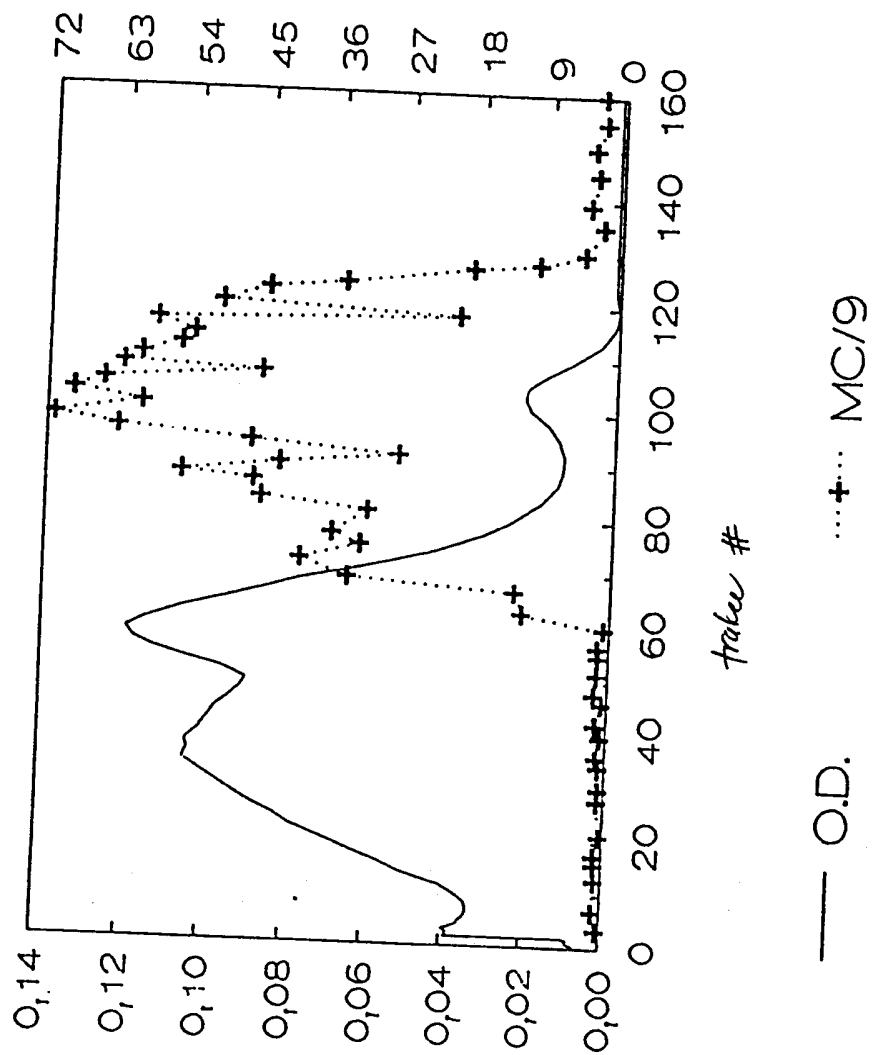
TISK PV488-97

60247

215

Obr. 37

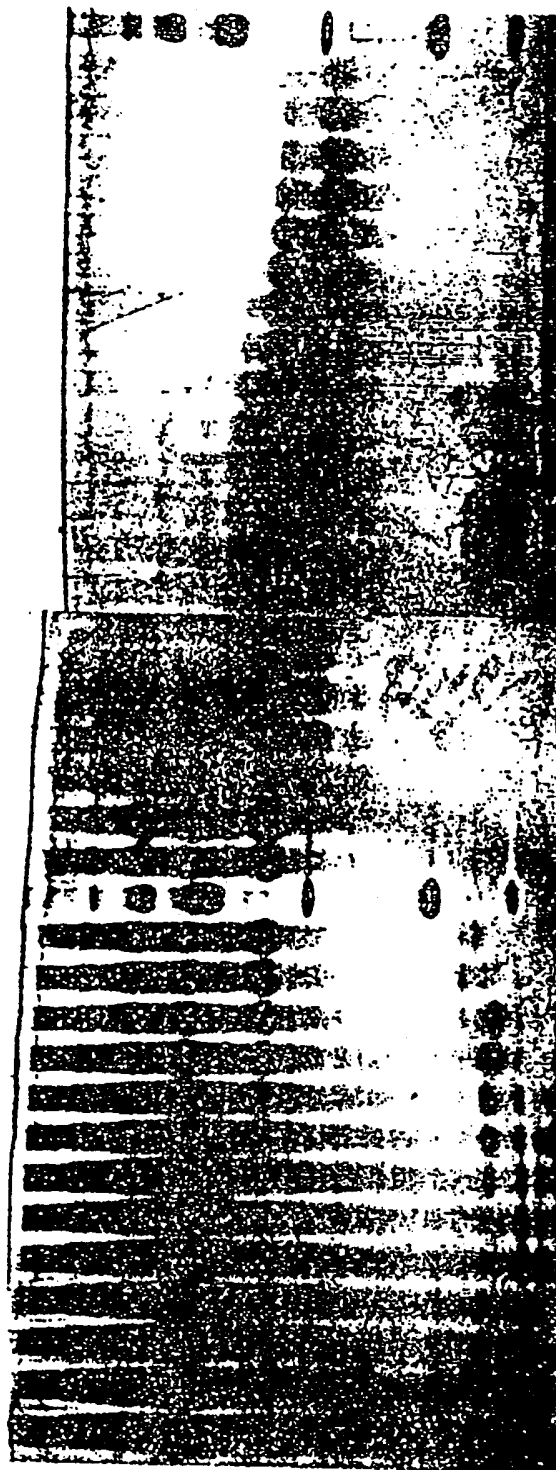
MC/9 CPM ($\times 10^{-3}$).



O.D. 280nm ($\times 10^1$)

Obr. 38

48 54 57 60 66 69 72 78 81 84 86 88 90 92 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124



97,4 -

66,2 -

42,7 -

31,1 -

21,5 -

14,4 -

216

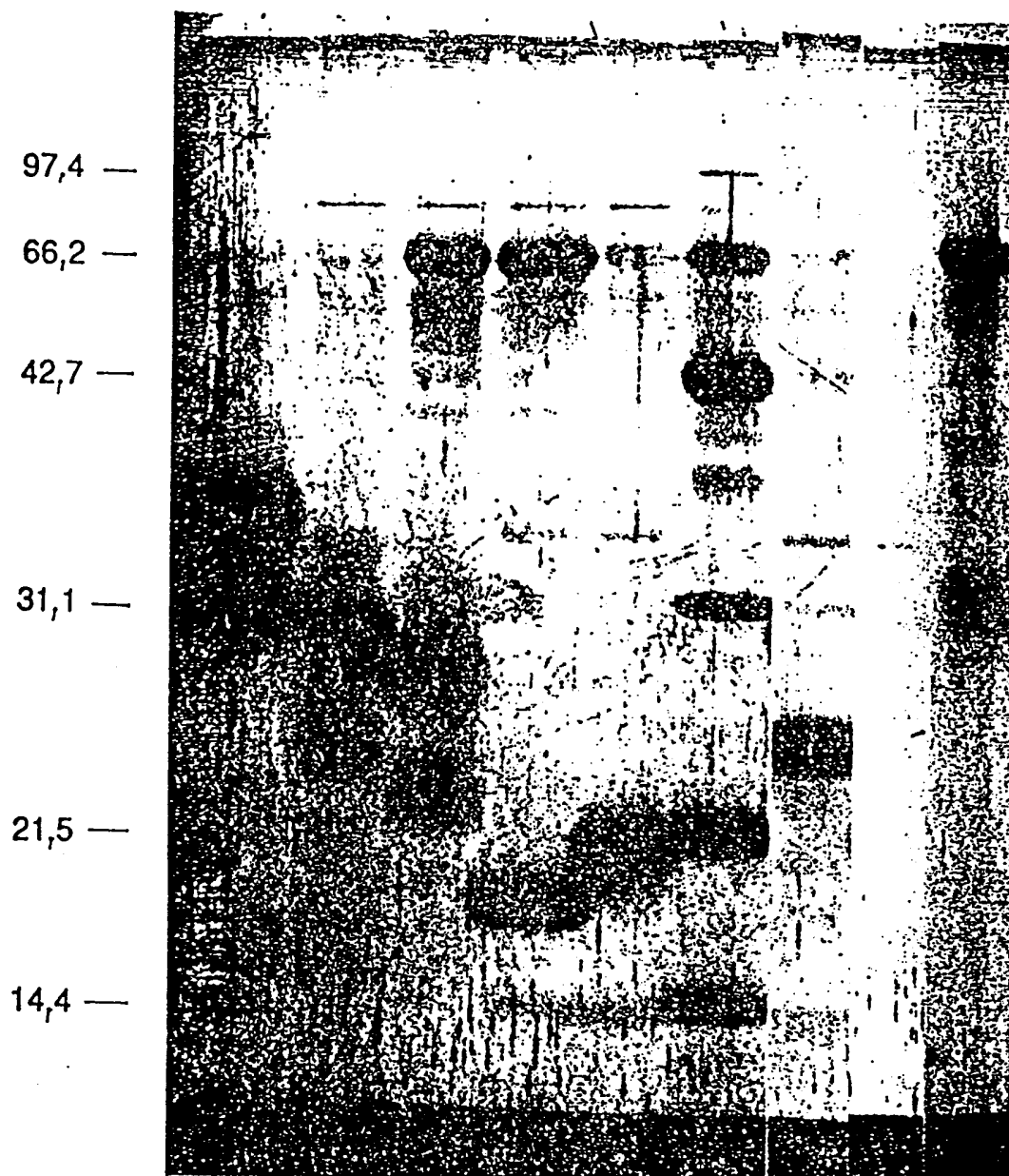
DSE

PV 488-94

60071

PV 488-94 60047

1 2 3 4 5 6 7 8 9



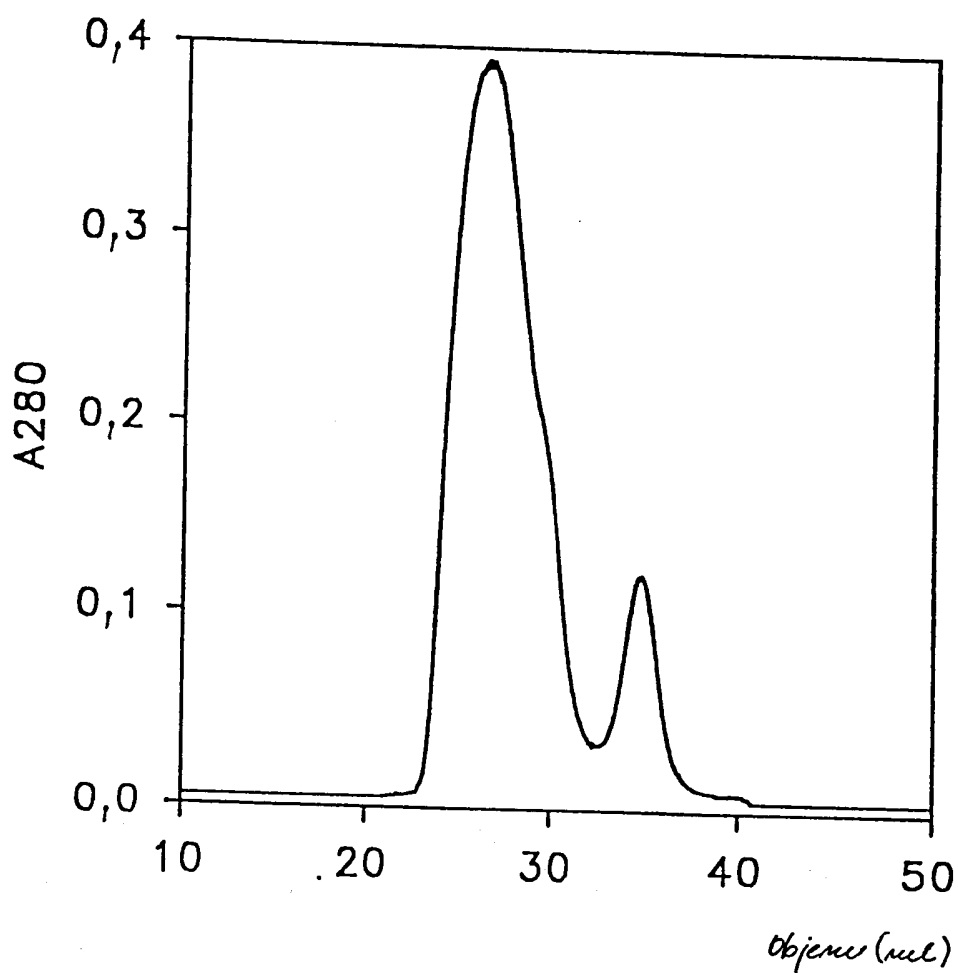
28

ПСК

7V488-97

60047

Obr. 40A



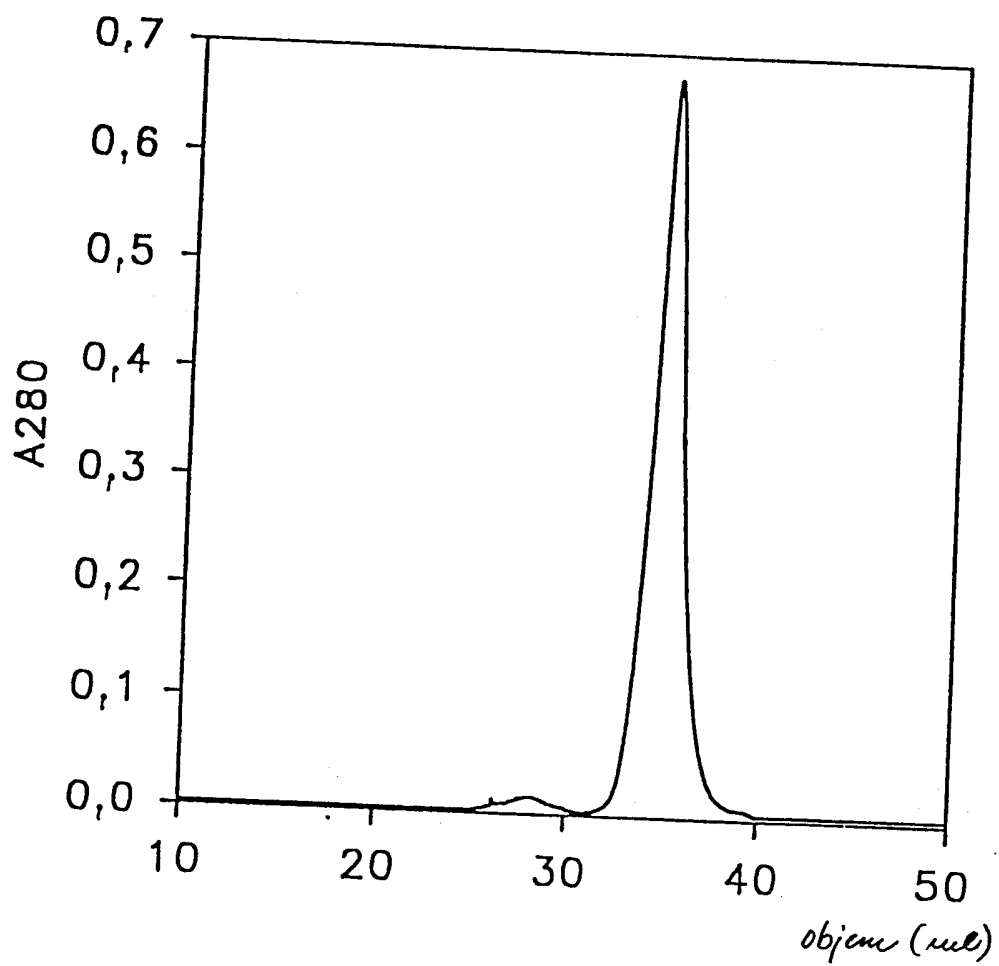
49

TISK

PV488-97

6047

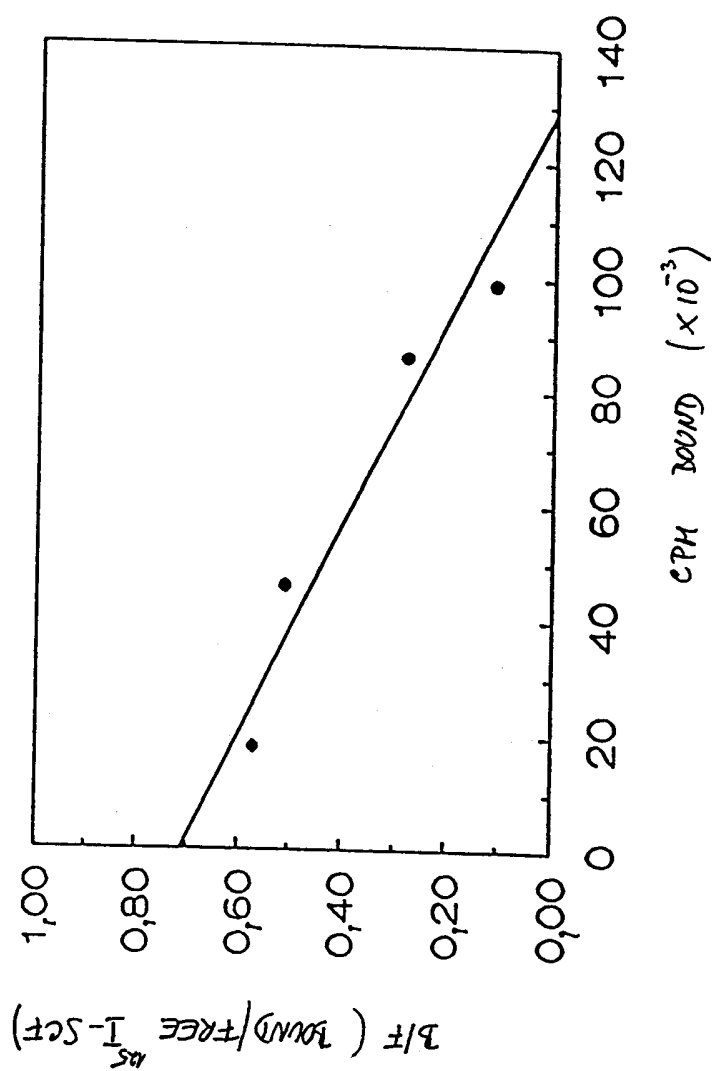
Obr. 40B



220

MSK PV 488-97 60277

Obr. 41



Obr. 42A

CCGCCTCGCGCCGAGACTAGAACGCGCTGCGGGAAGCAGGGACAGTGGAGAGGGCGCTGCGC 61

TCGGGCTACCCAATGCGTGGACTATCTGCGCGCGCTGTTCGTGCAATATGCTGGAGCTCCA 122

GAACAGCTAAACGGAGTCGCCACACCACTGTTTGTGCTGGATCGCAGCGCTTTCCTT 183

-25

Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Leu Thr Cys Ile Tyr Leu Gln
ATG AAG AAG ACA CAA ACT TGG ATT CTC ACT TGC ATT TAT CTT CAG 228

-10

Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg
CTG CTC CTA TTT AAT CCT CTC CTC AAA ACT GAA GGG ATC TGC AGG 273

10

Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala
AAT CGT GTG ACT AAT AAT GTA AAA GAC GTC ACT AAA TTG GTG GCA 318

30

Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly
AAT CTT CCA AAA GAC TAC ATG ATA ACC CTC AAA TAT GTC CCC GSG 363

40

Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val
ATG GAT GTT TTG CCA AGT CAT TGT TGG ATA AGC GAG ATG GTA GTA 408

60

Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn
CAA TTG TCA GAC AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCA AAT 453

3

778K

7U 488-97

60077

Obr. 42B

Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val
 ATT TCT GAA GGC TTG AGT AAT TAT TCC ATC ATA GAC AAA CTT GTG 498

Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 AAT ATA GTG GAT GAC CTT GTG GAG TGC GTG AAA GAA AAC TCA TCT 543

Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe
 AAG GAT CTA AAA AAA TCA TTC AAG AGC CCA GAA CCC AGG CTC TTT 588

Thr Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala
 ACT CCT GAA GAA TTC TTT AGA ATT TTT AAT AGA TCC ATT GAT GCC 633

Phe Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val
 TTC AAG GAC TTT GTA GTG GCA TCT GAA ACT AGT GAT TGT GTG GTT 678

Ser Ser Thr Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr
 TCT TCA ACA TTA AGT CCT GAG AAA GAT TCC AGA GTC AGT GTC ACA 723

222

TISK PV488-94

6047

Obr. 42C

160
 Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn 170
 AAA CCA TTT ATG TTA CCC CCT GTT GCA GCC AGC TCC CTT AGG AAT 768

 Asp Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp 180
 GAC AGC AGT AGC AGT AAT AGG AAG GCC AAA AAT CCC CCT GGA GAC 813

 Ser Ser Leu His Trp Ala Ala Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser 200
 TCC AGC CTA CAC TGG GCA GCC ATG GCA TTG CCA GCA TTG TTT TCT 858

 Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg 210
 CTT ATA ATT GGC TTT GCT TTT GGA GCC TTA TAC TGG AAG AAG AGA 903

 Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu Asn Ile Gln Ile Asn Glu 230
 CAG CCA AGT CTT ACA AGG GCA GTT GAA AAT ATA CAA ATT AAT GAA 948

 Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg Glu Phe 240
 GAG GAT AAT GAG ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA GAG TTT 993

 Gln Glu Val 248
 CAA GAA GTG TAA

 TTGTGGCTTGATCAACACTGTTACTTTCGTACATTGGC 1044

123

775K

PV488-94

60247

Obr. 42D

TGGTAACAGTTCATGTTTGCTTCATAAATGAAGCAGCTTTAAACAATTCATATTTCTGTC 1104

TGGAGTGACAGACCACATCTTTATCTGTTCCTTGCTACCCCATGACTTTATATGGATGATTC 1164

AGAAATTGGAACAGAAATGTTTACTGTGTGAAACTGGCAGCTGAATTAATCATCTATAAAGAA 1224

GAACTTGCAATGGAGCAGGACTCTATTTTAAAGGACTGCCGGGACTTGGGTCTCATTTAGAAC 1284

TTGCAGCTGATGTTGGAAGAGAAAGCACGCTCTCAGACTGCATGTACCATTTGCATGGC 1344

TCCAGAAATGCTCTAAATGCTGAAATAAACACCTAGCTTTATTTCTTCAGATACAAAACCTGCAG 1404

124

T14C

PV 488-94...

6044

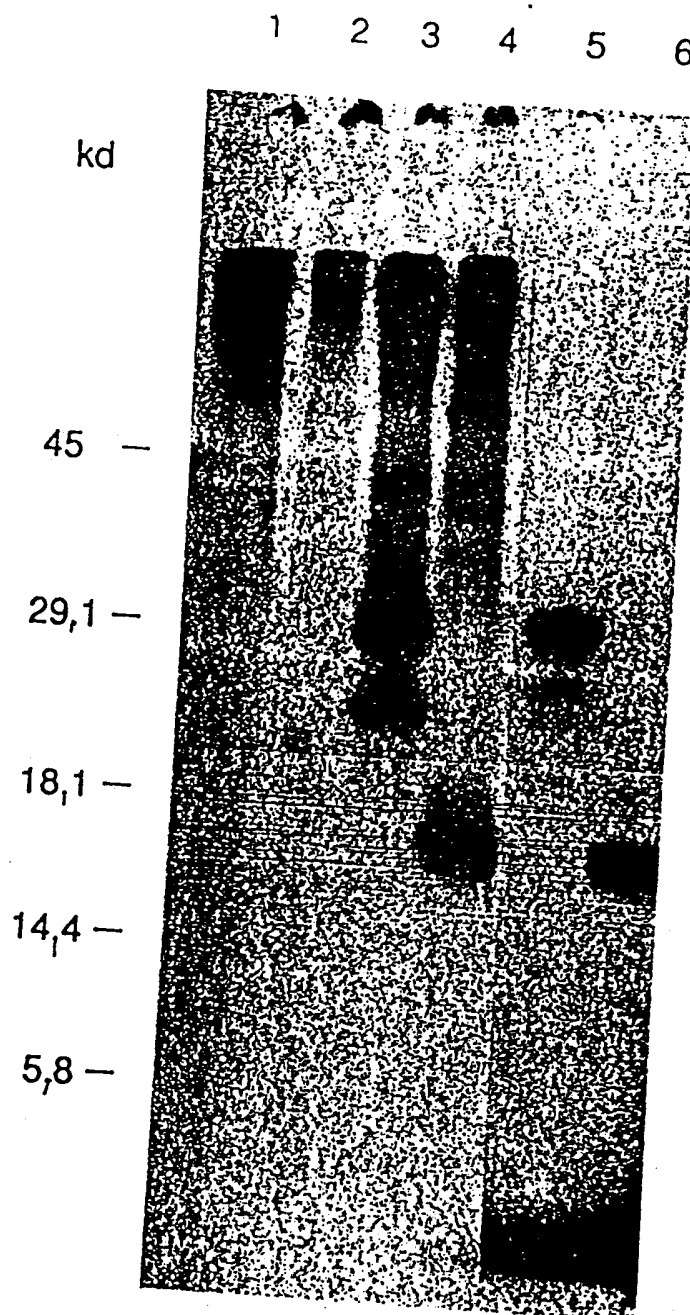
725

TISK

PV488-97

~~6027~~

Obr. 43



Obr. 44A

AGCAGGGACAGTGGAGAGGGCGCTGCGCTC 30
 GGGCTACCCAATGCGTGGACTATCTGCCGCCGCTGTTCGTGCAATATGCTGGAGCTCCAG 90
 AACAGCTAAACGGAGTCGCCACACCACTGTTTGTGCTGGATCGCAGCGCTGCCCTTTCCTT 150
 -25
 Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Leu Thr Cys Ile Tyr Leu Gln
 ATG AAG AAG ACA CAA ACT TGG ATT CTC ACT TGC ATT TAT CTT CAG 195
 -10
 Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg
 CTG CTC CTA TTT AAT CCT CTC GTC AAA ACT GAA GGG ATC TGC AGG 240
 10
 Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala
 AAT CGT GTG ACT AAT AAT GTA AAA GAC GTC ACT AAA TTG GTG GCA 285
 30
 Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly
 AAT CTT CCA AAA GAC TAC ATG ATA ACC CTC AAA TAT GTC CCC GGG 330
 40
 Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val
 ATG GAT GTT TTG CCA AGT CAT TGT TGG ATA AGC GAG ATG GTA GTA 375

226

TISK

PV488-97

60277

Obr. 44B

Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn
 CAA TTG TCA GAC AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCA AAT 420

 Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val
 ATT TCT GAA GGC TTG AGT AAT TAT TCC ATC ATA GAC AAA CTT GTG 465

 Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser
 AAT ATA GTG GAT GAC CTT GTG GAG TGC GTG AAA GAA AAC TCA TCT 510

 Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe
 AAG GAT CTA AAA AAA TCA TTC AAG AGC CCA GAA CCC AGG CTC TTT 555

 Thr Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala
 ACT CCT GAA GAA TTC TTT AGA ATT TTT AAT AGA TCC ATT GAT GCC 600

 Phe Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val
 TTC AAG GAC TTT GTA GTG GCA TCT GAA ACT AGT GAT TGT GTG GTT 645

 Ser Ser Thr Leu Ser Pro Glu Lys Gly Lys Ala Lys Asn Pro Pro
 TCT TCA ACA TTA AGT CCT GAG AAA GGG AAG GCC AAA AAT CCC CCT 690

227

7751C

7V488-94

6027

Obr. 44C

160
 Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala Met Ala Leu Pro Ala Leu 170
 GGA GAC TCC AGC CTA CAC CAC TGG GCA GCC ATG GCA TTG CCA GCA TTG 735

 Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Leu Tyr Trp Lys
 TTT TCT CTT ATA ATT GGC TTT GCT TTT GGA GCC TTA TAC TGG AAG 780

 180
 Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu Asn Ile Gln Ile 200
 AAG AGA CAG CCA AGT CTT ACA AGG GCA GTT GAA AAT ATA CAA ATT 825

 190
 Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg
 AAT GAA GAG GAT AAT GAG ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA 870

 210
 Glu Phe Gln Glu Val
 GAG TTT CAA GAA GTG TAA TTGTGGCTTGTATCAACACTGTTACTTTCGTA 920
 CATGGCTGGTAACAGTTTCATGTTTGCTTCATAAATGAAGCAGCTTTAAACAATTTCATA 980
 TTCTGTCTGGAGTGACAGACCACATCTTTATCTGTCTTCTTGCTACCCATGACTTTATATGG 1040
 ATGATTCAGAAATTGGAACACAGAATGTTTTACTGTGAAACTGGCAGCTGA 1088

228

775K

PV 488-94

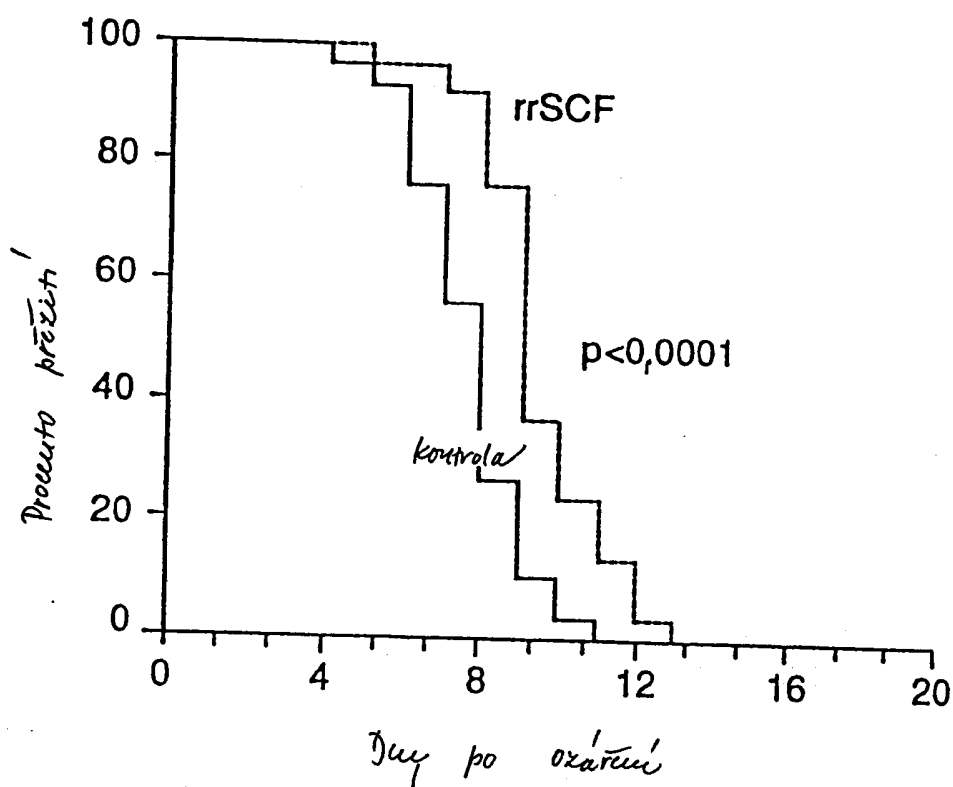
60771

229

775K PV488-97

~~6047~~

Obr. 45

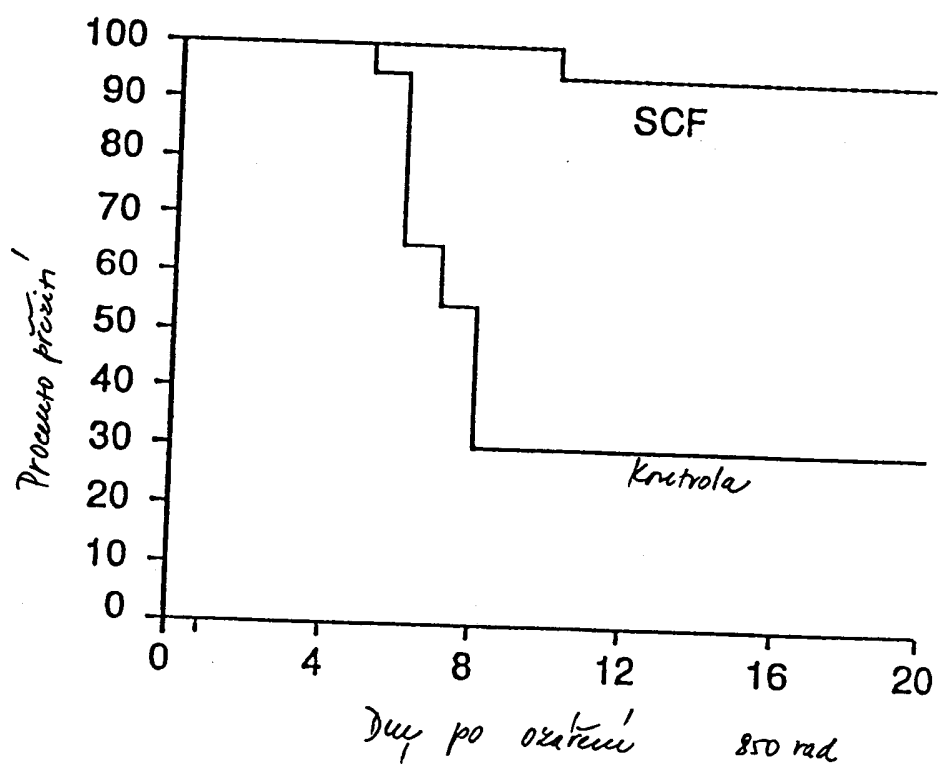


230

DISK: PU488-94

~~60077~~

Obr. 46



137

TISK DV 488-94

~~60277~~

Obr. 47

