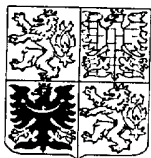


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 305

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997 - 491**

(22) Přihlášeno: **15.10.1990**

(30) Právo přednosti:

16.10.1989	US	1989/422383
11.06.1990	US	1990/537198
24.08.1990	US	1990/573616
01.10.1990	US	1990/589701

(40) Zveřejněno: **12.01.2000**

(Věstník č. 1/2000)

(47) Uděleno: **13.01.2000**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15.03.2000**
(Věstník č. 3/2000)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(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)

(73) Majitel patentu:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA,
US;

(72) Původce vynálezu:

Zsebo Krisztina M., Thousand Oaks, CA, US;
Suggs Sideny Vaughn, Newbury Park, CA, US;
Besselmann 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 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. 42A-C, 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.

CZ 286305 B6

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

5 Oblast techniky

Vynález se týká čištěného a izolovaného polypeptidu, vykazujícího hematopoetickou 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.

10

Dosavadní stav techniky

15 Lidský krev–vytvářející (hematopoetický) 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 hematopoetických 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 hematopoetický 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, anémií nebo trombocytopenií. Vývoj a užití hematopoetických 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.

30

Protože hematopoetické 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.

35 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–CSP) (Lee a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 4360–4364/1985), Wong a spol., Science, 228, 810–814 (1985), myší 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) 45 (Kawasaki a spol., Science, 230, 291 (1985)).

„High Proliferative Potential Colony Forming Cell“ (HPF–CFC) zkouškový systém testuje činnost faktorů v raných hematopoetických progenitorech (Zont., J. Expr. Med. 159, 679–690 (1984)). V literatuře existuje množství zpráv o faktorech, které jsou aktivní v HPP–CFC zkoušce. Zdroje těchto faktorů jsou uvedeny v tabulce 1. Nejlépe charakterizované faktory jsou uvedeny dále.

50

Aktivita v upraveném médiu 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 rané HPP-CSF, SF-1 byl zjištěn v upraveném médiu 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 média (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 hematopoetické progenitory, které jsou zralější než cílený SF-1.

Bylo prokázáno, že jiná třída synergických faktorů je přítomna v médiu z buněk TC-1 (buňky odvozené ze stromatu kostní dřeně). Tato buněčná linie produkuje faktor, který stimuluje rané 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. Vztaheno 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.

25

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))

30

¹CM = upravená média

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, karboxymethylcelulóza, 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 imunogenitu a antigenitu proteinu. Výsledkem je, že požadované biologické aktivity in vivo je možno dosáhnout podáním takového aduktu polymer-protein s menší frekvencí 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 léčení 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 savcích druhů 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 aspartátového a glutamátového vedlejšího řetězce, alfa-karboxylová skupina karboxyl-koncové aminokyseliny, tyrosinové vedlejší řetězce, nebo k aktivovaným derivátům glykosylových řetězců, připojených 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-hydroxysukcinimid, 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 reaktanty, obsahující aminové, hydrazinové nebo hydrazinové skupiny, jsou vhodné pro reakci s aldehydy, generovanými jodistanovou oxidací karbohydrátových skupin v proteinech.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí faktoru, který způsobuje růst raných hematopoetických progenitorových buněk.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je čištěný a izolovaný polypeptid, mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence, uvedené na obr. 42A–C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hematopoetickou 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:

5 a) polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 42A–C: 1–248, 1–189, 1–188, 1–185, 1–180, 1–156, 1–141, 1–137, 1–130, 1–164, 2–164, 5–164 a 11–164, popřípadě s methioninovým zbytkem na N–konci; a

10 b) polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 42A–C: 1–120, 1–110, 1–100, 1–133, 1–127 a 1–123, popřípadě s methioninovým zbytkem na N–konci.

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

15 (a) DNA sekvencí, uvedených na obr. 42A–C, nebo jejich komplementárních řetězců,

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

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

25 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–savcích buňkách;

30 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;

35 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;

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

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

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

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

Zejména se může jednat o léčivo pro

- 5 a) léčbu leukopenie, léčbu trombocytopenie, léčbu anémie, 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;
- 10 b) pro zvýšení počtu buněk schopných transplantace po aspiraci kostní dřeně nebo periferní krevní leukoferesi;
- 15 c) pro léčení AIDS, myelofibrosis, myelosklerózy, osteoporózy, metastatického karcinomu, akutní leukemie, mnohotného myelomu, Hodgkinovy choroby lymfomu, Gaucherovy choroby, Niemann–Pickovy choroby, Letterer–Siwovy choroby, odolné erythroblastické anémie, Di Guglielmova syndromu, kongestivní splenomegalie, Kala azar, sarkoidózy, 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
- 20 e) pro léčení hypopigmentační poruchy.

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

- 25 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
- 30 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.

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

40 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 oběhovým poločasem a zvýšenou biologickou účinností.

Popis obrázků na připojených výkresech

50 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-agaróze z čištění savčího SCF.

Obr. 4 představuje kationtovýměnný chromatogram z čištění savčího SCF.

Obr. 5 představuje C₄ chromatogram čištění savčího SCF.

5

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.

10

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

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

15

Obr. 10 představuje analytický chromatogram čištěného savčího SCF.

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

20

Obr. 12 představuje

A. oligonukleotidy kryší SCF cDNA,

B. oligonukleotidy lidské SCF DNA,

25

C. univerzální oligonukleotidy.

Obr. 13 představuje

30

A. schéma polymerázové řetězové reakce (PCR) amplifikaci kryší SCF a cDNA,

B. schéma PCR amplifikace lidské SCF cDNA.

Obr. 14 představuje

35

A. sekvenční strategii pro kryší genomovou DNA,

B. sekvenci nukleokyselin kryší genomové DNA,

40

C. sekvenci nukleokyselin kryší SCF cDNA a aminokyselinovou sekvenci kryšího SCF proteinu.

Obr. 15 představuje

A. strategii sekvenování lidské genomové DNA,

45

B. sekvenci nukleové kyseliny lidské genomové DNA,

C. kompozit sekvence nukleové kyseliny lidské SCF cDNA a aminokyselinové sekvence SCF proteinu.

50

Obr. 16 představuje seřazené aminokyselinové sekvence lidského, opičího, psiho, myšího a kryšího 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.
- 5 Obr. 20 představuje
- A. radioimunostudii savčího SCF,
- 10 B. SDS–PAGE imunitně vysráženého savčího SCF.
- Obr. 21 představuje Western analýzy rekombinantního lidského SCF.
- Obr. 22 představuje Western analýzy rekombinantního krysího SCF.
- 15 Obr. 23 představuje sloupcový diagram účinku COS–1 buňkami produkovaného rekombinantního krysího SCF na transplantaci kostní dřeně.
- Obr. 24 představuje účinek rekombinantního krysího SCF na léčení makrocytické anémie myší Steel.
- 20 Obr. 25 představuje periferní bílé krvinky (WBC) u myší Steel, ošetřených rekombinantním krysím SCF.
- Obr. 26 představuje počet destiček u myší Steel, ošetřených rekombinantním krysím SCF.
- 25 Obr. 27 představuje rozdíl v počtu WBC u Steel myší, ošetřených rekombinantním SCF^{1–164}PEG25.
- Obr. 28 představuje lymfocytové subsety Steel myší, ošetřených rekombinantním krysím SCF^{1–164}PEG25.
- 30 Obr. 29 představuje účinek rekombinantní lidské sekvence SCF při ošetření normálních primátů se zvýšeným počtem periferních WBC.
- 35 Obr. 30 představuje účinek rekombinantní lidské sekvence SCF při ošetření normálních primátů na zvýšení počtu hematokritů a destiček.
- Obr. 31 představuje fotografie
- 40 A. kolonií lidské kostní dřeně, stimulované rekombinantním lidským SCF^{1–162},
- 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
- 45 A. s redukčním činidlem,
- B. bez redukčního činidla.
- 50 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,

5 B. bez redukčního činidla.

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

10 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.

15 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 deglykosylaci.

20 Obr. 40 představuje

A. gelovou filtrační chromatografii reakční směsi rekombinantního krysího pegylovaného SCF^{1–164},

25 B. gelovou filtrační chromatografii rekombinantního krysího SCF^{1–164}, nemodifikovaného.

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

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

Obr. 43 představuje autoradiograf z COS–7 buněk, exprimujících lidský SCF^{1–248}, a CHO buněk, exprimujících lidský SCF^{1–164}.

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

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

40 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.

45 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.

50

Podrobný popis vynálezu

V souladu s předloženým vynálezem je poskytnut nový čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci, uvedenou na obr. 42A–C.

V souladu s předloženým vynálezem je poskytnut nový čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci, uvedenou na obr. 42A–C: 1–248, 1–189, 1–188, 1–185, 1–180, 1–156, 1–141, 1–137, 1–130, 2–164, 5–164 a 11–164.

5

Dalším aspektem předloženého vynálezu je čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedena na obr. 42A–A, obsahující popřípadě methioninový zbytek v N–terminální poloze.

10 Dalším aspektem předloženého vynálezu je čištěný a izolovaný polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 42A–C: 1–130, 1–120, 1–110, 1–100, 1–133, 1–127, a 1–123, který popřípadě obsahuje další methioninový zbytek na N–konci.

15 Výraz „faktor kmenových 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 raných 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) 20 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).

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

Rané 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.

35

Biologická aktivita a model tkáňové distribuce SCF ukazuje jeho centrální úlohu v embryogenezi a hematopoezi, jakož i jeho schopnost léčit různých deficiencí kmenových buněk.

40 Předkládaný vynález poskytuje DNA sekvence, které obsahují: inkorporaci kodonů „výhodných“ pro expresi vybranými nesavčími hostiteli; opatření míst pro štěpení restrikcími endonukleázovými enzymy a opatření dalšími počátečními, koncovými nebo intermediárními DNA sekvencemi, které umožňují konstrukci snadno exprimovatelných vektorů. Předkládaný vynález také poskytuje DNA sekvence, kódující polypeptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 14, které se liší od přirozeně se vyskytujících forem ve shodnosti nebo umístění jednoho 45 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 50 specificky poskytuje DNA sekvence, kódující plnou délku nezpracované aminokyselinové sekvence, jakož i DNA sekvence, kódující 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 podmínkách) 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 kódu. Specificky, jsou to ty sekvence, které jsou uvedeny v části b) a c) genomické DNA sekvence, kódující alelické varianty SCF a/nebo kódující SCF z jiných savčích druhů, a vyrobené DNA sekvence, kódující 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 kódují 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 plazmidových DNA vektorů, nových a užitečných transformovaných a transfekovaných 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, kódující 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 tímtež 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 prokaryotním nebo eukaryotním 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 jakýmkoliv 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
 5 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 mutagenézí ke generování analogů a derivátů SCF. Takové produkty mají alespoň jednu
 10 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 antagonisté mohou být plně využity, například
 15 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
 20 vlastnosti u syntetických peptidů, které v podstatě duplikují aminokyselinovou sekvenci, existující v přirozeně se vyskytujících proteinech, glykoproteinech a nukleoproteinech. Specifičtější, 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
 25 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); Lerner 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.,
 30 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.

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

40 SCF může být čištěn technikami známými v oboru. Je popsána metoda čištění SCF z SCF materiálu, jako jsou kondiciovaná média nebo lidská moč a sérum. 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 imobilizo-
 45 vanou 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.

50 Izoformy 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. 5.856.298).

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 množstvím, 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 pufrы (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, metabisulfid sodný), ochranné látky (např. Thimerosal, benzylalkohol, parabeny), botnací přísady nebo modifikátory tonicity (např. laktóza, 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 sloučenin, jako je polymléčná kyselina, kyselina polyglykolová, hydrogely atd. nebo do liposomů, mukroemulzí, micelů, jednovrstvých nebo vícevrstvých vehikulí, erytrocytových hostitelů nebo sféroplastů. 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 ¹²⁵I 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 radioizotopy, 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 hematopoiezy. 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-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 která může být léčitelná SCF. Aplastická anémie je poškození kmenových buněk, při kterém je hematopoetická tkáň nahrazena tukem, a pancytopenie, SCF zvyšuje hematopoetickou proliferaci a je vhodný při léčbě aplastické anémie (příklad 8B). Steel myši byly použity jako modely lidské aplastické anémie (Jones, Exp. Hematol., 11, 571–580 (1983)). Slibné výsledky byly získány použitím cytokinu příbuzného GM-CSF v léčbě aplastické anémie (Antin a spol., Blood 70, 129a (1987)). Paroxysmální nocturální hemoglobinurie je porucha kmenových buněk, charakterizovaná formováním defektních destiček a granulocytů, jakož i abnormálních erytrocytů. Existuje mnoho chorob, které jsou léčitelné SCF. Patří sem následující: myelofibróza, myeloskleróza, osteoporóza, metastatický karcinom, akutní leukemie, multiplikovaný myelom, Hodgkinova choroba, lymfom, Gaucheroova choroba, Nieman–Pickova choroba, Letterer–Siwe choroba, neústupná erytroblastická anémie, Di Guglielmův syndrom, kongestivní splenomegalie, Kala azar, sarcoidosis, primární slezinová pancytopenie, miliární tuberkulóza, houbové choroby, septikemie, malárie, nedostatek vitamínu B₁₂ a kyseliny listové, nedostatek pyridoxinu, Diamond Blackfan anémie, hypopigmentační choroby, jako je vitiligo a piebaldismus. Erythroidy, megakaryocyty a granulocyty stimulující vlastnosti SCF jsou uvedeny v příkladech 8B a 8C.

Nárůst růstu nehematopoetických kmenových buněk, 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 raný 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 dovoluje intenzifikaci dávky v antineoplastickém nebo radiačním ošetření (příklad 19).

SCF je užitečný pro expresi raných 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

dřeň 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 leukoporezou pro zvýšení množství buněk, vhodných pro transplantaci; kostní dřeň je léčena in vitro kvůli aktivaci nebo nárůstu počtu buněk před transplantací; nakonec je 5 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 raných hematopoetických kmenových buněk, které mají být transfektovány. Kultivace 10 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 fibróza.

15 SCF je užitečný pro léčbu syndromu získané imunodeficience (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 léčit zvýšit absolutní hladinu cirkulujících T-helper ($CD4^+$, $CD4^+$) lymfocytů. Tyto buňky jsou primárním buněčným cílem 20 viru lidské imunodeficience (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)).

25 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 neoplasii (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).

30 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 35 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 40 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 séra. Druhá 45 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, popsána původně Köhlerem a Milsteinem (Eur. J. Immunol. 6, 511–519 (1976)), byla aplikována v širokém 50 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 neomezuji.

Příklad 1

Čištění/charakteristika faktoru kmenových buněk z média, 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 rané 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 rané hematopoetické buňky využívá HPP-CFC zkušební systém myší kostní dřev, získanou ze zvířat 2 dny po léčbě 5-fluoruracilem (5-FU). Chemoterapeutické léčivo 5-FU selektivně vyčerpává pozdní hematopoetické progenitory s následující detekcí raných 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 McCoyovo médium (GIBCO), 20 % fetálního hovězího séra, 0,3 % agaru a 2×10^5 buněk kostní dřev/ml. McCoyovo kompletní médium obsahuje následující složky: 1 x McCoyovo médium, doplněné 0,1 mM pyruvátu, 0,24 x esenciálními aminokyselinami, 0,24 x neesen-
ciálními 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 dřev 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 dřev 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 myší kostní dřev, 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“ linii, MC/9 (ATCC CRL 8036). MC/9 buňky jsou kultivovány se zdrojem IL-4 v souladu s ATCC CRL 8036 protokolem. Médium, použité v biozkoušce, je RPMI 1640, 4 % fetálního hovězího séra, 5×10^{-5} M 2-merkaptioethanolu 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, zpracováním 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

5

Byla zjišťována akce čištěného savčího SCF jak přirozeně získaného, tak rekombinantního, bez interferujících kolonií stimulujících faktorů (CSF) na normální nevyčerpané kostní dřeň. CFU-GM zkouška (Broxmeyer a spol., Exp. Hematol., 5, 87 (1977)) je použita ke zhodnocení účinku vlivu SCF na normální dřeň. Stručně – všechny buňky kostní dřeně 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 dřeň byl čištěný savčí krysí SCF pluripotentní CSF, stimulující růst kolonií, obsahujících nezralé buňky, neurofily, makrofágy, eosinofily a megarokaryocyty, 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.

20

B. Kondicionované médium

Jaterní buňky krys 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 mikronosiče periodickým zpětným proplachováním, dosaženým systémem řízených ventilů a počítačem řízených čerpadel. Každé síť alternativně pracuje jako přívod média a výchozí síť. Oscilující vyvolaný tok tak zabezpečuje, že se síť neucpávají. Okysličení 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 hovězího 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 média prostého séra pro odstranění většiny séra (koncentrace proteinu < 50 µg/l). Reaktor byl pak vsádkově provozován, dokud koncentrace glukózy neklesla pod 2 g/l. Od tohoto bodu pracoval reaktor v kontinuální perfuzní 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 média prostého séra, které bylo použito jako výchozí materiál pro čištění přirozeného ze savčích buněk získaného kryšího SCF.

C. Čištění

50

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

1. Aniontovýměnná chromatografie na DEAE–celulóze

Kondicionované médium, získané ze séra prosté kultivace BRL 3A buněk, bylo čištěno filtrací přes 0,45 µm Sartocapsules (Sartorius). Několik různých podílů (41 l, 27 l, 39 l, 30,2 l, 37,5 l a 161 l) bylo odděleně zahuštěno, zpracováno výměnou diafiltrace/pufu 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 41 bylo následující. Filtrované kondicionované médium 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 pufrem. Po aplikaci vzorku byl sloupec promyt 2050 ml tris–HCl pufu a solným gradientem (0 až 300 mM NaCl v tris–HCl pufu, 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 µl 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 média, podrobených zahuštění, výměně diafiltrace/pufu 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 µg/ml. Celkový objem kondicionovaného média, použitého v této přípravě, byl 336 l.

2. ACA 54 gelová filtrační chromatografie

Frakce, mající biologickou aktivitu ze 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), ekvilibrováný 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 koeluje s hlavním proteinovým píkem, a proto byl připraven jeden pool frakcí.

3. Chromatografie na agaróze 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 agarózy s aglutininem z pšeničných klíčků (5 x 24,5 cm, pryskyřice od E–Y Laboratories, San Mateo, CE; aglutinin z pšeničných klíčků rozpoznává určité karbohydrátové struktury) ekvilibrováným ve 20 mM tris–HCl, 500 mM NaCl, pH 7,4. Po aplikacích vzorku byl sloupec promyt asi 2200 ml pufu sloupce a eluce vázaného materiálu pak byla provedena aplikací roztoku 350 mM N–acetyl–D–glukosaminu, rozpuštěného v pufu 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 μ l 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.

5 4. Kationtovýměnná chromatografie na S–Sephrose s rychlým průtokem

Frakce 211 až 225 z chromatografie na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků, uvedené na obr. 3, a ekvivalentní frakce z 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 22 000 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. Cpm 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.

25 5. Chromatografie, používající uhlovodíkové pryskyřice, navázané na oxidu křemičitém

Frakce 4 až 40 z kolony S–Sephrosy na obr. 4 byly spojeny (540 ml). 450 ml tohoto poolu bylo spojeno se stejným objemem pufru B (10 mM octanu amonného, pH 6 : izopropanol) a aplikováno průtokovou rychlostí 540 ml/h na C₄ kolonu (Vydac Proteins c₄, 2,4 x 2 cm) ekvilibrovanou pufrům A (60 mM octan amonný, pH 6 : izopropanol, 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–Sephrose, výchozí vzorek z kolony C₄, souhrn poolu a promytý pool byly upraveny na 40 μ g/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 μ l podíly gradientových frakcí spojeny s 360 μ l fosfátem pufrovaného salinického roztoku, obsahujícího 16 μ g hovězího sérového 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 μ l 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 μ l vzorku ošetřeného pufrům (neredukujícím, tj. bez 2–merkapt ethanolu) a vařeny 5 minut před nanesením na gel. Dráhy A a B představují výchozí kolonový materiál (75 μ l z 890 ml) a materiál prošlý kolonou (75 μ l z 880 ml), číslované značky na levé straně obr. představují migrační polohy (reduované) 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 biozkuškami. 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–Sephárosové chromatografii (tj. obr. 4, frakce 62 až 72, časnější frakce v solném gradientu), byl také čištěn C_4 chromatografií. Vykazuje stejné chování při SDS–PAGE a měl stejné N–terminální aminokyselinové sekvence (viz příklad 20) jako materiál, získaný C_4 chromatografií na frakcích, prošlých S–Sephárosou.

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	objem (ml)	celkem	protein (mg) ⁵
kondicionované médium	335,700		13,475
DEAE celulóza ¹	2,900		2,164
ACA–54	550		1,513
aglutinin z pšeničných klíčků–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–Sephárosovou chromatografii, byl odstraněn odstředěním. Vzorek po odstředění (480 ml) obsahoval 264 mg celkového proteinu.

3. Kombinace aktivních gradientových frakcí ze dvou pokusů na C_4 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 µl poolu z první C₄ kolony v pokuse bylo použito (dráha 1), a 40 µl 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 v 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 obr. 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-merkptoethanol, 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-glukosaminyl/asparagin amidáza) byla použita v koncentraci 10 jednotek/ml.

Stejně výsledky jako na obr. 9 byly získány při zpracování neznačeného čištěného SCF glykosidázou a vizualizaci produktu postříbřením 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 použití 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-merkptoethanolu, 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-zesítěný 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-zesítěného 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 difuzně 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 demonstrovány 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 izokratickou 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 detekován žádný hlavní pik 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-zesítené karbohydrátové skupiny, kovalentně připojené k proteinům (viz příklad 1D). Šest ml poolovaného materiálu z frakcí 4 až 6 z C_4 kolony na obr. 5 se suší za vakua. Pak se přidá 150 μ l 14,25 mM CHAPS, 100 mM 2-merkapt ethanolu, 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 polyvinyl-difluoridu (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-zesítený 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 proteinové sekvence byla provedena za použití programů doporučených výrobcem (Hewick a spol., J. Biol. Chem., 256 7990–7997) a uvolněné fenylothiohydantoinylaminokyseliny byly analyzovány on-line za použití mikrootvorné 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 smíšené 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-koncově blokové 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 blokováné 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

Předpověď 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:

5 PE-AP místo štěpení

10

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

20

10 -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-

15 -Leu-Arg-Asp-....

xxx, v poloze 43 nestanoveno.

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

20

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
25 byl sušen a štěpen v 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:

30

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 a	37,3	
CB-16		oba peptidy obsahují sekvenci CB-15

1. Nebyly detekovány aminokyseliny v polohách 12, 13 a 25. Peptid b nebyl sekvenován na konci.

2. (N) v CB-15 nebyl detekován, 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 kód: 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.

10 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-A-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-T- -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 označována.
2. Aminokyselina v poloze 12 nebyla 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 detekována, byla považována za Asn vzhledem k potenciálnímu N-vázanému glykosylačnímu místu. Aminokyselina v poloze 21 nebyla detekována.

30 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) byl podroben 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:

standardů derivatizovaných aminokyselin (1 pmol). V době 0 byl detekován kontaminující glycin. Alanin byl jedinou aminokyselinou, která stoupala s inkubačním časem. Po 2 hodinách inkubace byl Ala detekován 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.

15

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 detekována v žádném z izolovaných peptidů. Nicméně sekvence byla detekována 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.

25

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 detekován a proto může být jen částečně glykosylován, pokud vůbec je. Ser-142, Thr-143 a Thr-155 předpovězené z DNA sekvence, nebyly detekovány 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.

35

K. Analýza složení aminokyselin faktoru BRL kmenových buněk

40

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

45

Dva 70 µl vzorky byly odděleně hydrolyzovány v 6N HCl, obsahující 0,1 % fenolu a 0,05 % 2-merkptoethanolu při 11 °C za vakua po 24 hodin. Hydrolyzáty byly sušeny, rekonstituovány v pufru 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).

50

Tabulka 3

Kvantitativní složení aminokyselin v savčím SCF

Amino- kyseliny	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

5

vypočtená molekulová hmotnost 18,424³

1. Vztaženo na 158 zbytků z proteinové sekvenční analýzy (s výjimkou Cys a Trp).

10 2. Teoretické hodnoty, vypočtené z údajů proteinové sekvence (A) nebo z údajů DNA sekvence (B).

3. Vztaženo na 1–164 sekvence.

15 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.

20 Příklad 3

Klonování genů pro krysí a lidský SCF

A. Amplifikace a sekvenování krysích SCF cDNA fragmentů

25

Determinace aminokyselinové sekvence fragmentů krysího SCF proteinu umožnila označit smíšenou sekvenci oligonukleotidů, specifickou pro krysí SCF. Oligonukleotidy byly využity jako hybridizační sondy ke zjištění krysí 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 zjištěné restrikcčními endonukleázami. Sekvence jsou zapsány 5' → 3'.

Krysí genomová knihovna, krysí jaterní genomová knihovna a dvě BRL cDNA knihovny byly zjištěny použitím ³²P–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 plazmidových vektorů, které dovolují expresi kódovaného peptidového produktu.

Základní strategie pro získání DNA sekvence krysí 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 krysí SCF cDNA. Primery, použité v těchto PCR, byly smíšené oligonukleotidy, vztažené na aminokyselinové sekvence, uvedené na obr. 11. Použitím sekvenční informace, získané z PCR 90,6 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 kódujícího regionu krysí 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 krysí 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)celulázové 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. Přebytek octanu amonného byl přidán pro neutralizaci roztoku a cDNA byla nejprve extrahována fenol/chloroformem, pak extrahována chloroformem/izoamylalkoholem 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)).

- 5 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
10 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,
15 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
20 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
25 uskutečněno dideoxysekvenováním (Sanger a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463–5467 (1977)) PCR produktů a srovnáním předpokládaných translačních produktů se sekvenční informací SCF peptidu.

- V počátečních PCR experimentech byly použity smíšené oligonukleotidy, založené na SCF
30 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, kódující aminokyseliny –25 až 162.

- V PCR 90,6, byla BRL cDNA amplifikována se 4 pmol 222–11 a 223–6 v reakčním objemu
35 20 µl. Části produktu PCR 90,6 byly elektroforézovány na agarózovém gelu a byly pozorovány proužky přibližně očekávané velikosti. Jeden µl 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 agarózovém gelu. Asymetrická
40 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
45 značených sond (PCR2).

- K izolování 5' konce cDNA krysího SCF byly primery, obsahující (dC)_n sekvence, komplementární k poly(dG) koncům cDNA, využity jako nespecifické primery. SCF 90,3 obsahuje (dC)₁₂
50 (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 agarózovém gelu. Jeden µl produkovaného roztoku byl dále amplifikován za přítomnosti 25 pmol (dC)₁₂ a 10 pmol 223–6 v objemu 25 µl v 15 cyklech, anelován při 45 °C. Půl µl 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 agarózovém gelu nebyly

pozorovány žádné pruhy. Bylo provedeno 25 dalších cyklů PCR při 40 °C, po kterých byl pozorován jeden prominentní pruh. Byl proveden „blotting“ podle Southerna a byl pak pozorován jeden výrazný hybridizovaný pruh. Dalších 25 cyklů PCR (625,1), při 45 °C, bylo provedeno za použití 210–7 a usazeného primeru 224–27. Sekvenování bylo provedeno po
 5 asymetrické amplifikaci prostřednictvím PCR, získaly se sekvence, které obsahovaly po domnělém aminokonci předpokládanou signální peptid kódující sekvenci pre-SCF. Tato sekvence je využita k označení oligonukleotidového primeru 227–29, obsahujícího 5' konec kódujícího regionu cDNA kryšího SCF. Obdobně 3' DNA sekvence, končící na aminokyselině 162, byla získána sekvenováním PCR 90,4 (viz obr. 13.A).

10

B. Klonování genomové DNA kryšího buněčného kmenového faktoru

Sondy, získané z PCR amplifikace cDNA, kódující kryší SCF, jak je popsáno výše v části A, byly použity k prohledání knihovny, obsahující kryší genomové sekvence (získané od
 15 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.

20 PCR byla použita ke generování ^{32}P -značených sond, použitých ve screeningu genomové knihovny. Sondy 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 polymerázu (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
 25 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.

30 Přibližně 10^6 bakteriofágů bylo umístěno na plotnu, jak popisuje Maniatis a spol. (supra (1982)). Plaky byly transferovány na GeneScreen PlusTM 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.

35 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.
 40 Bakteriofágové klony z oblasti ploten, odpovídající radioaktivním bodům, byly přemístěny z ploten a znovu prohledány sondami PCR 1 a PCR 2.

DNA z pozitivních klonů byla štěpena restrikcí endonukleázami MabHI, SphI nebo SstI a výsledné fragmenty byly subklonovány do pUC119 a následně sekvenovány. Strategie pro
 45 sekvenování kryší genomové SCF DNA je schematicky znázorněna na obr. 14A. Na tomto obrázku křivka nakreslená nahoře představuje oblast kryší genomové DNA, kódující SCF. Mezery v křivce indikují oblasti, které nejsou sekvenovány. Velké rámečky představují exony kódujícího 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.
 50

Použitím PCR 1 sondy ke screeningu kryší genomové knihovny byly izolovány klony, odpovídající exonům, kódujícím aminokyselinou 19 – 176 SCF. Aby se získaly klony pro další

exony kódujícího regionu pro aminokyselinu 19, byla knihovna screenována použitím oligonukleotidových sond 228 – 30. Stejná sada filtrů, jaká byla použita dříve se sondou PCR1, 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 oblasti 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, kódujícím aminokyselinu –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 (SCF^{1-162} a SCF^{1-164}) a proteinu (SCF^{1-193}), předpovězených z translace genové sekvence na obr. 14C.

Expresní vektor, užitý v těchto studiích, byl „shuttle“ vektor, obsahující pUC119, SV40 a HTLV I 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, popsáno v Souzově US patentu č. 4810643, který je zde uváděn jako odkaz.

cDNA pro krysí SCF^{1-162} byla vložena do plazmidového 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 μl objem, obsahuje 1x reakční pufr (z Perkin Elmer Cetus kitu), 250 μM dATP, 250 μM dCTP, 250 μM dGTP a 250 μM 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 cyklů za stejných podmínek s výjimkou toho, že teplota chlazení byla změněna na 55 °C. Produkty PCR byly štěpeny restričními endonukleázami HindIII a SstII. V19.8 byl shodně HindIII a SstII a v jednom případě byl štěpený plazmidový 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., supra (1987)). DNA, připravená z jednotlivých bakteriálních klonů, byla sekvenována Sangerovou dideoxymetodou. Obr. 17 představuje konstrukci V19.8 SCF. Tyto plazmidy 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 SCF^{1-162} , 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, obsahujícím 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 µl), obsahující 1x reakční pufr 250 µM každého z dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 2,5 jednotek Taq polymerázy, 20 ng V19.8:SCF¹⁻¹⁶² a 20 picomol každého primeru. cDNA byla amplifikována 35 cyklů použitím denaturační teploty 94 °C 1 minutu, teploty chlazení 55 °C po 2 minuty a elongační teploty 72 °C po 2 minuty. Produkty amplifikací byly štěpeny restriktčními endonukleázami hindIII a SstII a inzertovány do V19.8. Výsledný vektor obsahuje kódující oblast pro aminokyseliny –25 až 164 SCF, následovanou terminačním kodonem.

cDNA pro 193 aminokyselinami tvořený kryší SCF (kryší SCF¹⁻¹⁹³ je předpovězen z translace DNA sekvence na obr. 14C) byla také vložena do plazmidového vektoru V19.8 použitím postupu shodného s postupem, použitým pro kryší 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 kryší genomové DNA (obr. 14B). Reakční směs, 50 µl objem, obsahovala 1x reakční pufr (z kitu Perkin Elmer Cetus), 250 µM dATP, 250 µM CTP, 250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM d GTP a 250 µM 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, teploty chlazení 50 °C po 2 min a teploty 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 restriktčními endonukleázami HindIII a SstII. V19.9 DNA byla štěpena HindIII a SstII a dlouhé fragmenty ze štěpení byly izolovány z agarózového 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 plazmidy byly použity k transfekci savčích buněk v příkladu 4.

30 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 kryší SCF cDNA.

RNA byla připravena jak popisuje Maniatis a spol. (supra (1982)). PolyA+ RNA byla připravena použitím oligo dT celulózy 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 sekvence, příbuzná alespoň části kryší SCF sekvence, 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 kryší SCF cDNA, byla zkoušena provedením PCR s 1 µl produktu PCR 22.7 použitím vnitřně usazeného kryšího 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) dala vzniknout jednomu proužku majoritního produktu stejné velikosti, jako odpovídající kryší 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 μ l 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 kryší SCF produkt, a po asymetrické amplifikaci (PCR 42.3) poskytla sekvenci, která byla vysoce homologní ke kryšímu SCF, jestliže byl 224–24 použit jako sekvenční primer. Unikátní sekvence oligonukleotidů, cílených pro lidskou SCF cDNA byly syntetizovány a jejich sekvence je uvedena na obr. 12B.

K získání lidského protějšku kryší SCF PCR generované kódující sekvence, která byla použita ve studiu exprese a aktivity, byla provedena PCR s primery 227–29 a 227–30 v 1 μ l 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 kryším 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 kryší monolog 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 kryší PCR fragmenty v sekci C. DNA z jednotlivých bakteriálních klonů byla sekvenována Sangerovou dideoxy-metodou.

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 agarózového 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 směsí 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 směsí, 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 ³²P–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 ³²P–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 plazmidového vektoru pGEM3–hSCF (Promega Madison, Wisconsin). Rekombinantní pGEM3:hSCF plazmidová DNA byla pak linearizována štěpením HindIII. ³²P–značená ribosonda 1 byla připravena z linearizované plazmidové DNA „runoff“ transkripcí s T7 RNA polymerázou v souladu s instrukcemi, poskytovanými Promegou. Reakční směs (3 μ l) obsahovala 250 ng linearizované plazmidové DNA a 20 μ M ³²P–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.

- 10 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 ribosondy 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 restrikčními 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, kódující aminokyseliny 40–176 a tyto klony jsou uloženy v ATCC (depon. č. 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 plazmidová DNA byla linearizována restrikční 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, kódující SCF, mezery ve křivce indikují oblasti, které nebyly sekvenovány. Velké rámečky představují exony, kódující oblast SCF genu s odpovídajícími kódovanými 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 sekvenční oblasti ohraničené 3' koncem dvou primerů. Jednostranná PCR, jak ukazuje příklad 3A, může přinést sekvenční sousedních oblastí. Jednostranné PCR bylo použito k poskytnutí sekvence 5'–netranslatovatelné 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. Nepřipevněný 5637 první řetězec cDNA, popsaný 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, 233–14, 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 velikosti 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' kódující oblasti vedle očekávaného místa, jak ukazuje mapování restrikcí enzymy 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 ³²P 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 Sangerova 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 vařící vodné lázně na 5 minut, pak chlazeny s terminální transferázou za přítomnosti 8 µM dATP v pufru, obsahujícím CoCl₂ (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 blízko 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 µl vody a výřez byl roztaven při 84 °C v tavném bloku. PCR, obsahující primery 221–12 a 235–29 (8 pmol oba) ve 40 µl bylo naočkováno 2 µl 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 µl 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 µl, byl naočkován 2 µl 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 µl PCR reakčního

5 produktu a 40 pmol buď primeru 221–12 nebo primeru 235–29 v celkovém reakčním objemu 10 µl bylo podrobeno 25 cyklům PCR (1 minuta, 95 °C, 30 sekund 55 °C, 40 sekund 72 °C). Přímé sekvenování 221–12 směsí primovaných PCR produktů (po standardní extrakci a ethanolo-
 5 lovém srážení) se ³²P–značeným primerem 262–13 (obr. 12B) poskytlo 5' sekvenci nukleotidů 1–179 (obr. 15C).

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

10 Screening lidské genomové knihovny SCF oligonukleotidovými sondami neodhalil žádné klony, obsahující známou část prvního kódujícího enzymu. Pokus byl pak iniciován použitím jednostranné PCR techniky k amplifikaci a klonování genomových sekvencí, obklopujících tento exon.

15 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.
 20 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 agarózovém gelu odhalila, že většina produktů byla krátkých (menších než 300 bp). K obohacení druhů byla část každého agarózového gelového proužku, odpovídajícího délce větší než 300 bp, vyříznuta a elektroforeticky eluována.
 25 Po ethanolovém srážení a znovu rozpuštění ve vodě byly gelové přečištěné PCR produkty klonovány do derivátů pGEM4, obsahujících SfiI místo jako HindIII až SfiI fragment.

Kolonie byly screenovány ³²P značeným prvním exonovým oligonukleotidem SCF. Bylo identifikováno několik pozitivních kolonií a sekvence inzertů byly získány Sangerovou metodou.
 30 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 kódující oblasti z myši, opice a psa.

35 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
 40 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 kódující 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–
 45 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 kryšího 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 kódující oblasti všech pěti druhů. Aminokyselina, očekávaná na konci zralého proteinu podle analogie s kryším SCF, je označena na tomto obrázku číslem 1. Psí cDNA sekvence obsahuje nejasnost, která se projevuje dvojznačností valin/leucin v aminokyselinové sekvenci v kodonu 12a. Lidská, opičí, kryší 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. Předpokládá se, že SCF sekvence bezprostředně před a po domnělém zpracování místa blízko zbytku 164 je vysoce mezi druhy konzervována.

15

Příklad 4

Expresie rekombinantního SCF v COS-1 buňkách

Pro transienční expresi v COS-1 buňkách (ATCC CNL 1650) byl transfekován vektor V19.8 (příklad 3C), obsahující kryší SCF¹⁻¹⁶² a SCF¹⁻¹⁹³ geny, duplicitně na 60mm plotny (Wigler a spol., Cell, 14, 725-731 (1978)). Plazmid V19.8 SCF je uveden na obr. 17. Vektor bez inzertu byl také pro kontrolu transfekován. 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 ³H-thymidinem získaná data z typického transfekčního experimentu. Výsledky biozkušky supernatantů z COS-1 buněk, transfekovaných následujícími plazmidy, jsou uvedeny v tabulce 4 a 5: koncový okleštěný tvar kryšího SCF s C-koncem v aminokyselinové poloze 162 (V19.8 kryší SCF¹⁻¹⁶²), obsahující kyselinu glutamovou v poloze 81 [V.M.8 kryší SCF¹⁻¹⁶² (Glu81)] a SCF¹⁻¹⁶², obsahující alanin v poloze 19 [V19.8 kryší SCF¹⁻¹⁶² (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 biozkuškách, použitých k čištění přírodního savčího SCF v příkladu 1.

35

Tabulka 4

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

40

Vzorek	objem zkoušeného CM (μl)	kolonie č./200 000 buněk
V19.8 (bez inzertu)	100	0
	50	0
	25	0
	12	0

Tabulka 4 - pokračování

Vzorek	objem zkoušeného CM (μl)	kolonie č./200 000 buněk
V19.8 krysí SCF ¹⁻¹⁶²	100	>50
	50	>50
	25	>50
	12	>50
	6	30
	3	8
V19.8 krysí SCF ¹⁻¹⁶² (Glu81)	100	26
	50	10
	25	2
	12	0
V19.8 krysí SCF ¹⁻¹⁶² (Ala19)	100	41
	50	18
	25	5
	12	0
	6	0
	3	0

5 Tabulka 5

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

Vzorek	objem zkoušeného kultiv. média (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 SCF^{1–162} 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 synergickou 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./100 000 buněk (±SEM)
Salinický	0
GM–SCF	7 ± 1
G–SCF	24 ± 1
IL–3	5 ± 1
CSF–1	0
SCF ^{1–162}	0
GM–CSF ± SCF ^{1–162}	29 ± 6
G–CSF + SCF ^{1–162}	20 ± 1
IL–3 + SCF ^{1–162}	11 ± 1
CSF–1 + SCF ^{1–162}	4 ± 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 plazmidu pDSVE.1. Plazmid pDSVE.1 (obr. 18) je derivátem pDSVE, konstruovaný štěpením pDSVE restričním enzymem Sall a ligací k oligonukleotidovému fragmentu, obsahujícímu dva oligonukleotidy



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.

10

Tabulka 7

Zkouška absorpce ³H-thymidinu ze stabilních CHO buněk

Transfektovaná DNA	objem zkoušeného kondicionovaného média	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

15

B. Rekombinantní lidský SCF

Expresce SCF v CHO buňkách byla také dosažena použitím expresního vektoru pDSVRα2, 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 pDSRα2 SCF byl získán dvoustupňovým způsobem. V19.8 SCF byl štěpen restričním enzymem BamHI a SCF inzert byl ligován do BamHI místa pGEM3. DNA z pGEM3 SCF byla štěpena s HindIII a SalI a ligována do pDSR 2 štěpené HindIII a BalI. Stejný postup byl opakován pro lidské geny, kódující 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 radioimunitními 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. září 1990 v ATCC (CRL 10557) a označen Hu164SCF17.

30

Tabulka 8

Zkouška hPBL kolonií kondicionovaného média ze stabilních CHO buněčných linií, transfekto-
vaných lidskou SCF DNA

5

Transfektovaná DNA	zkoušené médium (μl)	počet kolonií/10 ⁵
pDSRα2hSCF ¹⁻¹⁶⁴	50	53
	25	45
	12,5	27
	6,25	13
pDSRαhSCF ¹⁻¹⁶²	10	43
	5	44
	2,5	31
	1,25	17
	0,625	21
žádná (CHO kontrola)	50	4

Příklad 6

10 Exprese rekombinantního SCF v E.coli

A. Rekombinantní kryší SCF

15 Tento příklad se týká exprese v E.coli SCF polypeptidů pomocí DNA sekvence, kódující (Met⁻¹) kryší SCF¹⁻¹⁹³ (obr. 14C). I když může být použit jakýkoliv vhodný vektor pro expresi proteinu za použití této DNA, užitý plazmid byl pCFM156 (obr. 19). Tento plazmid 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.

20

5'CGATTTGATTCTAGAACGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3'
3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'

25 Řízení exprese proteinu v pCFM1156 plazmidu je pomocí syntetického lambdy O_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, 30 které obsahuje AT6 iniciační kodon, předchází multirestrikční místo klonující skupiny, následované lambda t-cop transkripční stop sekvencí.

Plazmid V19.8 SCF¹⁻¹⁹³, obsahující kryší SCF¹⁻¹⁹³ gen, klonovaný z PCR amplifikované cDNA (obr. 14C), jak popisuje příklad 3, byl štěpen BglII a AatII a 603 bp DNA fragment byl izolován. 35 Pro poskytnutí Met iniciačního kodonu a obnovení kodonů pro první tři aminokyselinové zbytky (Gln, Glu a Ile) kryšího SCF polypeptidu, byl vyroben syntetický oligonukleotidový linker

5' TATGCACCA 3'
3' ACGTCCTCTAG 5'

5 s NdeI a BglII lepivými konci. Malý oligonukleotid a kyslí SCF¹⁻¹⁹³ genový fragment byly vloženy ligací do pCFM156 v unikátních NdeI a SstII místech plazmidu, uvedených na obr. 19. Produktem této reakce je expresní plazmid, pCFM156 kyslí SCF¹⁻¹⁹³.

10 pCFM156 kyslí SCF¹⁻¹⁹³ plazmid byl transformován do kompetentních FMS E.coli hostitelských buněk. Selektce buněk, obsahujících plazmid, byla na bázi markerového genu pro antibiotickou rezistenci (kanamycin), přenášenou pCFM156 vektorem. Plazmidová DNA byla izolována z kultivovaných buněk a DNA sekvence syntetického oligonukleotidu a jeho spojení s kyslí SCF genem bylo potvrzeno DNA sekvenováním.

15 Pro konstrukci plazmidu pCFM156 kyslí SCF¹⁻¹⁶² kódujícího (Met⁻¹) kyslí SCF¹⁻¹⁶² polypeptid, byl izolován restriční fragment od EcoRI k SstII z V19.8 kyslího SCF a vložen ligací do plazmidu pCFM kyslího SCF¹⁻¹⁹³ v unikátních restričních místech EcoRI a SstII a takto se nahradí kódující oblast pro karboxylový konec kyslího SCF genu.

20 Pro konstrukci plazmidů pCFM156 kyslího SCF¹⁻¹⁶⁴ a pCFM156 kyslího SCF¹⁻¹⁶⁵, kódujících (Met⁻¹) kyslí SCF¹⁻¹⁶⁴ a (Met⁻¹) kyslí SCF¹⁻¹⁶⁵ byly izolovány EcoRI až SstII restriční fragmenty z PCR amplifikované DNA, kódující 3' konec SCF genu a byly označeny pro zavedení místně řízených změn v DNA v oblasti, kódující karboxylový konec SCF genu. DNA amplifikace byly provedeny použitím oligonukleotidových primerů 227-29 a 237-19 v konstrukci pCFM156 kyslího SCF¹⁻¹⁶⁴ a 227-29 a 237-20 v konstrukci pCFM156 kyslího SCF¹⁻¹⁶⁵.

B. Rekombinantní lidský SCF

30 Tento příklad se týká exprese v E.coli lidského SCF polypeptidu pomocí DNA sekvence, kódující (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ a (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁸³ (obr. 15C). Plazmid 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 restričními 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' ACCTTCCATAG 5'

40 s NdeI a PstI lepivými konci. Malý oligolinker a PCR odvozený genový fragment lidského SCF genu byly vloženy ligací do expresního plazmidu pCFM156 (jak již bylo popsáno) v unikátních NdeI a SstII místech v plazmidu, jak je uvedeno na obr. 19.

45 pCFM lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ plazmid byl transformován do kompetentních FMS E.coli hostitelských buněk. Selektce na plazmid, obsahující buněčné hostitele byla provedena na bázi markerového genu pro antibiotickou rezistenci (kanamycin), přenášeného na pCFM156 vektoru. Plazmidová DNA byla izolována z kultivovaných buněk a DNA sekvenováním byla potvrzena DNA sekvence lidského SCF genu.

50 Ke konstrukci plazmidu pCFM156 lidského SCF¹⁻¹⁸³ kódujícího (Met⁻¹) lidský SCF¹⁻¹⁸³ (obr. 15C), byl izolován EcoRI až HindIII restriční fragment, kódující karboxylový konec lidského SCF genu z pCEM lidského SCF¹¹⁴⁻¹⁸³ (popsaného dále) a SstI až EcoRI restriční fragment, kódující aminokonec lidského SCF genu, z pCFM156 lidského SCF¹⁻¹⁶⁴, a byl též

izolován restriční fragment z pCFM1156. Tři DNA fragmenty byly spolu ligovány za vzniku pCFM1156 lidského SCF¹⁻¹⁸³ plazmidu, který byl pak transformován do FMS E.coli hostitelských buněk. Po selekci kolonií použitím rezistence na kanamycin byla plazmidová DNA izolována a opravená DNA sekvence byla potvrzena DNA sekvenováním. pCFM1156 lidský SCF¹¹⁴⁻¹⁸³ plazmid 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 plazmidu 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 plazmid 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 média (viz tabulka 9). Kultura byla kultivována vsádkovým způsobem, dokud OD–600 kultury nebylo 3,5. V této době bylo zavedeno sterilní živné médium 1 (tabulka 10) do fermentoru za použití peristaltického čerpadla pro řízení rychlosti živin. Rychlost živného média byla exponenciálně s časem zvyšována do dosažení rychlosti růstu 0,15 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 přírůstek 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. Buněčná 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 rovné 20.

4) Živiny 2 jsou zaváděny do fermentoru rychlosti 300 ml/h.

Všechny ostatní operace jsou stejné jako u výše popsaného postupu včetně médií.

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

Tabulka 9

Složení vsádkového média

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

5

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

^b Roztok 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.

^c Vitaminový 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.

10

Tabulka 10

15 Složení živného média

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

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

^b Roztok 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.

20

^c Vitaminový 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.

25

Tabulka 11

Složení živného média 2

trypton	172 ^a
kvasničný extrakt	86
glukóza	258

30

^a všechny složky jsou uváděny v g/l.

Příklad 7

Imunozkouška detekce PCR

- 5 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
 10 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, $-60000\text{ cpm }^{125}\text{I}$ -SCF ($3,8 \times 10^7\text{ cpm}/\mu\text{g}$), 5 μl trasyolol a 0,400 μl SCF standardu, s pufrem (fosfátem pufrovaný salinický roztok, 0,1% hovězí sérový albumin, 0,05 Triton X-100, 0,025% azid) tvořící zbytek objemu. Antisérum pro druhý test bylo získáno z krve králíků, imunizovaných
 15 s 50% čistým přípravkem přírodního SCF z BRL 3A kondicionovaného média. 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
 20 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
 25 ^{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 imunoprecipitované ^{125}I -SCF, porovnávány s 0, 2, 100 a 200 ng SCF standardu. Jak je stanoveno snížením v precipitaci protilátkou v cpm pozorovaném v RIA
 30 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 SCF¹⁻¹⁶² a SCF¹⁻¹⁹³ jakož i lidský SCF¹⁻¹⁶² (příklady 4 a 9) a CHO buňkou exprimovaný krysí SCF¹⁻¹⁶²
 35 (příklad 5), byly podrobeny SDS-PAGE. Při následující elektroforéze byly proteinové pruhy přeneseny na 0,2 μm nitrocelulózou za použití zařízení Bio-Rad Transblot při 60 V po dobu 5 hodin. Nitrocelulózové 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 králíčího preimunního nebo imunního séra (imunizace popsána výše). Komplexy protilátka-antisérum
 40 byly vizualizovány za použití reagensů křenová peroxidáza-konjugovaný kozí anti-králíčí 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 2 a 5200 μl COS-1 buňkami produkovaného lidského SCF¹⁻¹⁶², dráhy 1 a 7 jsou 200 μl COS-1 buňkami
 45 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 difuzní pruh s M_r asi 30000 daltonů z COS-1 buněk, produkujících lidský SCF¹⁻¹⁶², ale ne z COS-1 buněk, produkujících lidský EPO.

50 Ve Western analýze, uvedené na obr. 22, dráhy 1 a 7 jsou 1 μg částečně čištěného přípravku krysího SCF¹⁻¹⁹³, produkovaného v E.coli, dráhy 2 a 8 jsou krysí SCF¹⁻¹⁹³, produkovaný COS-1 buňkou a čištěný na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků. Dráhy 4 a 9 jsou krysí SCF¹⁻¹⁶²,

produkovaný COS-1 buňkou, čištěný na agaróze s aglutininem z pšeničných klíčků, dráhy 5 a 10 jsou kryší SCF¹⁻¹⁶², 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 kryší¹⁻¹⁹³ (dráhy 1 a 7) migruje při zřejmě M_r -24000 daltonů, zatímco COS-1 buňkou produkovaný kryší SCF¹⁻¹⁹³ (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 SCF¹⁻¹⁶² 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 SCF¹⁻¹⁹³ (dráhy 2 a 8).

Expresní produkty kryšího SCF¹⁻¹⁶² z COS-1 a CHO buněk jsou série 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 jakýmkoliv kryšími nebo lidskými SCF expresními produkty.

Příklad 8

In vivo aktivita rekombinantního SCF

A. Kryší 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 m 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 anémii (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 detekována monitorováním předního „scatter“ profilu (FASCAN, Becton Dickinson) 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 dřev 5 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 dřevě.

10 B. In vivo aktivita krysího SCF u Steel myši

Mutace v S1 lokusu působí deficienci hematopoetických buněk, pigmentových buněk a zárodečných buněk. Hematopoetický defekt je manifestován jako snížení 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 15 (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 dřevě pro svoji sníženou schopnost poskytovat kmenové buňky (Bannerman, Prog. Hematol., 8, 131 (1973)). Gen kódující SCF je u Steel myši (S1/S1) 20 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. 25 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 30 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 séra. 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 35 (Brikmann, Westbury, NY). Existuje výrazná korekce makrocytové anémie u ošetřených zvířat vzhledem ke zvířatům kontrolním. Při ukončení ošetření se ošetřovaná zvířata nevrátila do počátečního stavu makrocytové anémie.

V pokusu, uvedeném na obr. 25 a 26, byly Steel–Dickie myši ošetřeny různými rekombinantními 40 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, SCF^{1–164} a SCF^{1–193}, jak je popsáno v příkladu 10. Dále byl také testován E.coli SCF^{1–164}, modifikovaný přidávkem polyethylenglykolu (SCF^{1–164}PEG25) jako v příkladu 12. Rovněž byl testován z CHO získaný SCF^{1–162}, produkováný jako v příkladu 5 a čištěný jako v příkladu 11. Zvířata byla podrobena odebrání krve srdeční punkcí stříkačkami se 45 3 % EDTA a tato byla umístěna do zkumavek s práškovou 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 SCF^{1–164}PEG25 jsou uvedeny na obr. 27. Absolutně jsou zvýšeny neurofil, monocyt, lymfocyt a destičky. Nejdramatičtější efekt je zřejmý s SCF^{1–164}PEG25.

50 Nezávislá měření lymfocytů byla rovněž provedena a údaje jsou uvedeny na obr. 28. Myši ekvivalent lidské CD4 nebo marker T helper buněk, je L3T4 (Dialynas, J. Immunol., 131, 2445 (1983)). Lyt–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 izotonicky s 10X Dulbecco fosfátovým pufrovaným salinickým roztokem PBS (Gibco, Grand Island, NY). Takto lyzovaná krev byla promyta dvakrát 1X PBS (Gibco, Grand Island, NY) doplněným 0,1 % fetálního hovězího séra (Flow Laboratory, McLean, V) a 0,1 % azidu sodného. Každý vzorek krve byl umístěn do misky s 96 jamkami s kulatým dnem a odstředěn. Buněčná peleta (obsahující 2–10 x 10⁵ buněk) byl resuspendována s 20 mikrolitry krysí anti-myši L3T4, konjugovaného s phycoerythrinem (PE) (Becton Dickinson, Mountain View, CA) a 20 µl krysí anti-myši Lyt-2 konjugovaného s fluoresceinizoithiokonjugátem, 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.

20 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: neošetření, n=3, SCF 100 µg/kg/den, n=6, a SCF 30 µg/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 µg/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 (hSCF^{1–164} modifikovaný přídatkem polyetylen glykolu jako v příkladu 12) byl také testován na normálních paviánech v dávce 200 µg/kg/den, podávané kontinuálně intravenózní infuzí 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.

40 Ošetření 200 µg/kg/den hSCF^{1–164}:

Zvíře č. M88320		Zvíře č. M88129	
den	WBC	den	WBC
0	5800	0	6800
+7	10 700	+7	7400
+14	12 600	+14	20 900
+16	22 000	+21	18 400
+22	31 100	+23	24 900
+24	28 100	+29	13 000
+29	9600	+30	23 000
+36	6600	+37	12 100
+43	5600	+44	10 700

Ošetření 200 µg/kg/den PEG-hSCF¹⁻¹⁶⁴:

Zvíře č. M88350		Zvíře č. M89116	
den	WBC	den	WBC
-7	12 400	-5	7900
-2	11 600	0	7400
+4	24 700	+6	16 400
+7	20 400	+9	17 100
+11	24 700	+13	18 700
+14	32 600	+16	19 400
+18	33 600	+20	27 800
+21	25 400	+23	20 700
+25	16 600	+27	20 200
+28	26 900	+29	18 600
+32	9200	+33	7600

5 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–buněkách, 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 obou zkouškách na myších, byl aktivní na lidské kostní dřeni. Kultivační podmínky byly následující: lidská kostní dřev od zdravých dobrovolníků byla odstředěna nad Ficoll–Hypaque gradienty (Pharmacia) a kultivována ve 2,1% methylcelulóze, 30% fetálním telecím séru, 6×10^{-5} M 2–merkapt-ethanolu, 2 mM glutaminu, ISCOVE médiu (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 a krysími SCF COS–1 supernatanty, je uveden v tabulce 12. Jsou započteny pouze ty kolonie, které mají velikost 0,2 mm nebo větší.

20

Tabulka 12

Růst kolonií lidské kostní dřevě jako odezva na SCF

25

Transfektovaný plazmid	objem CM zkouš. (µl)	kolonie poč./100 000 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 krysí 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 poměrem jádra: cytoplazma, jak je uvedeno na obr. 31B (zvětšení 400x). Šipky na obr. 31B představují: šipka 1 – cytoplazma, šipka 2 – jádro, šipka 3 – vakuola.
- 5 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 raných buněk z hematopoetické maturované sekvence jsou relativně velká vzhledem k cytoplazmě. Dále se cytoplazma imaturovaných buněk zbarvuje pomocí Wright–Giemsey tmavěji než jádro. Jak buňky zrají, je jádro proti cytoplazmě tmavší. Morfologie buněk lidské kostní dřeně, vzniklých z kultury
- 10 s rekombinantním lidským SCF, je v souladu se závěry, že konečným produktem a meziproduktem působení SCF je relativně imaturovaný hematopoetický progenitor.

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

Tabulka 13

20

Synergismus rekombinantního lidského SCF s dalšími faktory, stimulujícími lidské kolonie

	kolonie počet/10 ⁵ buněk (14 dní)
slepý pokus	0
hG-SCF	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.
- 25

Tabulka 14

Zkouška klonování KG-1 na měkkém agaru

Transfektovaný plazmid	zkoušený objem (μl)	kolonie poč./3000 buněk+SD (stand. odch.)
V19.8 (bez inzertu)	25	2 ±1
V19.8 lidský SCF ¹⁻¹⁶²	25	14 ±0
	12	8 ±0
	6	9 ±5
	3	6 ±4
	1,5	6 ±6
V19.8 kryší SCF ¹⁻¹⁶²	25	6 ±1
lidský GM-CSF	50 (5 ng/l)	14 ±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 (ultračistě), 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 17 700 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 konečná koncentrace složek ve směsi byly 2,5M močoviny (ultračistě), 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 g při teplotě místnosti (kratší doba (např. 20 h) je také vhodná), byla směs zahuštěna dvojnásobným průchodem ultrafiltračním zařízením Millipore Fcllicon s polysulfonovými membránovými kazetami pro dělení mol. hmotnosti 10 000 (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 (redukovaná), popsáným 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.

- 5 pH ultrafiltračního retentátu bylo upraveno na 4,5 přidáním 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 CunoTM 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
- 10 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 µl) z frakcí, odebíraných ze S-Sepharosové kolony, byly analyzovány SDS-PAGE,
- 15 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
- 20 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).

- 25 Frakce 22–38 ze 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.) ethanol, 12,5 mM HCl (roztok A) a operace byla prováděna při 4 °C. Pryskyřice kolony byla připravena suspendováním suché pryskyřice v 80% (obj./obj.)
- 30 ethanolu, 12,5 mM HCl (roztok B) a pak ekvilibrován 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
- 35 analyzovány absorbancí při 280 nm (obr. 35) a SDS-PAGE (25 µl 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
- 40 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
- 45 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 pufru. Rychlost průtoku vzorku při
- 50 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 pufrovaným salinickým roztokem při 4 °C. Frakce asi 5 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 objemu 525 ml, obsahujícího asi 2,3 SCF. Tento materiál byl sterilizován filtrací za použití zařízení Millipore Millipak 20 membránová vložka.

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

15 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 kódovaného iniciačním kodonem.

20 Podobnými postupy, uvedenými pro lidský SCF¹⁻¹⁶⁴, exprimovaný v E.coli, může být také získán krysí 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 krysí SCF¹⁻¹⁹³. Krysí SCF¹⁻¹⁹³ během skládání/oxidace jeví sklon ke tvorbě různě oxidovaných druhů a je nesnadnější odstranit tyto neočekávané druhy chromatograficky.

25 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 2 až 5 mM, nebo jinými inhibitory proteázy) a očekávané degradované formy mohou být odstraněny vhodnými dělicími stupni.

30 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.

40 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-merkaptioethanolu nebo jiného thiolu.

45 Mimo chromatografických popsáných postupů jsou vhodné i jiné postupy pro získání SCF ve vyčištěné aktivní formě, které zahrnují hydrofobní interakční chromatografii (např. použití fenyl-Sepharosy (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 chelátové-Sepharosy (Pharmacia) s Cu²⁺ 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
 5 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
 10 16, mohou využívat detergenty, zahrnující neionogenní detergenty, a lipidy, zahrnující fosfolipidy, obsahující liposomovou strukturu.

Příklad 11

15 Rekombinantní SCF ze savčích buněk

A. Fermentace CHO buněk, produkujících SCF

Rekombinantní buňky ovaria čínského křečka (CHO) (kmen CHO pDSR α 2 hSCF^{1–162}) byly
 20 kultivovány na mikronosičích ve 20litrovém perfuzním kultivačním systému pro produkci lidského SCF^{1–162}. 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 média Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMFM) a Ham's
 25 F–12 živná směs v poměru 1:1 (GIBCO), doplněná 2 mM glutaminu, neesenciálními aminokyselinami (ke zdvojnásobení existující koncentrace za použití 1:100 zředění Gibco č. 320–1140) a 5% fetálního bovinního séra. Získané médium 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
 30 přidáno 100 gramů pre-sterilizovaného mikronosiče cytodex–2 (Pharmacia) jako suspenze ve 3 litrech fosfátem pufrovaného salinického roztoku. Buňky byly ponechány napojit a růst na mikronosičích po dobu čtyř dnů. Růstové médium 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 séra–prostého média pro odstranění většiny séra (koncentrace proteinu < 50 μ g/ml). Reaktor byl pak provozován vsádkově, dokud koncentrace glukózy neklesla pod 2 g/l. Od tohoto momentu byl reaktor provozován s kontinuální
 35 perfuzní rychlostí asi 20 l/den. pH kultury bylo udržováno na $6,9 \pm 0,3$ úpravou průtoku CO₂. Rozpuštěný kyslík byl udržován na hladině vyšší než 20 % sycením vzduchem a podle potřeby doplňováním čistým kyslíkem. Teplota byla udržována na $37 \pm 0,5$ °C.

40 Z výše uvedeného systému bylo získáno přibližně 450 litrů kondicionovaného média a toto bylo použito jako výchozí materiál pro čištění rekombinantního lidského SCF^{1–162}.

Přibližně 569 litrů séra prostého kondicionovaného média bylo také získáno stejným postupem, ale za použití kmene CHO pDSR α 2 rSCH^{1–162} bylo použito jako výchozí materiál pro čištění
 45 kryšího SCF^{1–162}.

B. Čištění rekombinantního savčího exprimovaného kryšího SCF^{1–162}

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

1. Koncentrace a diafiltrace

Kondicionované médium, získané ze séra prosté kultivace buněčného kmene CHO pDSR α 2 krysího SCF¹⁻¹⁶², jak je popsáno v sekci A výše, bylo vyčiřeno filtrací přes 0,45 μ m 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 médium 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 média, 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 μ g/ml. Celkový objem kondicionovaného média, použitého pro tuto přípravu, byl asi 589 l.

2. Aniontovýmenná chromatografie na Q-Sepharose s rychlým průtokem

Koncentrované/diafiltrované přípravky z každé z pěti vsádek kondicionovaného média 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 aniontovýmennou kolonu Q-Sepharose 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 μ M CuSO₄ s pH asi 4,5. Kolona byla pak promyta 10 m Tris-HCl, 20 μ M CuSO₄, pH 6,7, pufru pro obnovení neutrálního pH a odstranění močoviny a solným gradientem (0–700 mM NaCl, v 10 mM Tris-HCl, 20 μ M CuSO₄, pH 6,7 pufr; 40 l objem celkem). Byly odebrány 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 μ l z každé označené frakce bylo zkoušeno. Eluáty, odebrané 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 (11 200 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 pufr 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–merkptoethanolem) 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)).

5

4. Aniontovýměnná chromatografie na Q–Sepharse 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 pufr pro snížení koncentrace ethanolu. Zředěný pool byl pak aplikován na aniontovýměnnou Q–Sepharsou kolonu s rychlým průtokem (3,2 x 3 cm, pryskyřice Pharmacia Q–Sepharse Fast Flow), která byla ekvilibrována 10 mM Tris–HCl, pH 6,7 pufr. 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 odbírány frakce 7,8 ml.

15

5. Sephacryl S–200 HR gelová filtrační chromatografie

Frakce, obsahující eluovaný protein z promývání aniontové Q–Sepharse 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 pufovaném 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.

25 Tabulka 15 představuje souhrn čištění.

Tabulka 15

30 Souhrnný přehled čištění savčího exprimovaného krysího SCF^{1–162}

Stupeň	objem (ml)	celkem	protein (mg) ^x
kondicionované médium (koncentrované)	7000		28 420
Q–Sepharse Fast Flow	11 200		974
C ₄ pryskyřice	1050		19
Q–Sepharse Fast Flow	31		20
Sephacryl S–200 HR	82		19 ^{xx}

^x Stanoveno metodou podle Bradforda (výše, 1976)

35 ^{xx} Stanoveno jako 47,3 mg kvantitativní aminokyselinovou analýzou za použití metody stejné, jak je uvedena v příkladu 2.

40 N–koncová aminokyselinová sekvence čištěného krysího SCF^{1–162} je přibližně polovina Gln–Glu–Ile... a polovina PyroGlu–Glu–Ile..., jak bylo stanoveno metodami podle příkladu 2. Tyto výsledky prokazují, že krysí SCF^{1–162} je produktem proteolytických štěpení mezi zbytky, označovanými jako čísla (–1)(Thr) a (+1)(Gln) na obr. 14C. Podobně čištěný lidský SCF^{1–162} z kondicionovaného média 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.

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

10 Další formy lidského SCF, odpovídající celému nebo části otevřeného rámečku, kódujícího aminokyseliny 1–248, uvedené na obr. 42 nebo odpovídající otevřenému čtecímu rámečku, kódujícímu 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

15 SDS–PAGE spojených frakcí z gelové filtrační kolony Sephacryl S–200 HR je uvedeno na obr. 39. 2,5 µl 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; zřejmá heterogenita je do značné míry způsobena heterogenitou při glykosylaci.

20 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 25 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–merkptoethanol, 0,04 % (hmotn./obj.) azid sodný, fosfátem pufovaný salinický roztok, 30 minut při 37 °C, s následující inkubací při polovině uvedených koncentrací za přítomnosti glykosidáz po 18 g při 37 °C. Neuraminidáza (z *Arthrobacter ureafaciens*, dodaný 30 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–glukosaminyl)asparaginamidáza) byla použita v koncentraci 10 jednotek/ml.

35 Kde je to žádoucí, byly provedeny různé kontrolní inkubace. Tyto zahrnují: inkubaci bez glykosidáz, pro ověření, že výsledky jsou způsobeny přidáním přípravky glykosidázy; inkubace s glykosylovanými proteiny (např. glykosylovaný rekombinantní lidský erythropoetin) 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 40 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 45 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 kyselina, 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 všechny materiál 50 představuje stejný polypeptid, s heterogenitou, která je způsobena hlavně heterogenitou při glykosylaci.

Příklad 12

Příprava rekombinantního SCF¹⁻¹⁶⁴PEG

- 5 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 μmol, SS-MPEG = Sigma Chemical Co. č. M3152, přibližná mol. hmotnost = 5000) v 0,327 ml deionizované vody byl
 10 přidán ke 13,3 mg (0,727 μmol) 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. 1,0 ml 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
 15 místnosti. Prvních 10 ml z kolony bylo odloženo a pak byly odebírány 1,0 ml frakce. Byla monitorována UV absorbance při 280 nm 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 μm 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-32. Spojené
 20 frakce 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 absorbcí roztoku 1,0 ml/ml nemodifikovaného krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ při 0,66. Nezreagovaný krysí SCF¹⁻¹⁶⁴, představující 11,8 % celkového proteinu v reakční směsi, byl eluován ve frakcích číslo 34 až 37. Za stejných chromatografických podmínek byl nemodifikovaný krysí SCF¹⁻¹⁶⁴ eluován jako hlavní pík
 25 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 aminoskupiny v krysím SCF¹⁻¹⁶⁴ zahrnují 12 lysinových zbytků a alfa-aminoskupinu na N-konci glutaminového zbytku. Poolované frakce PEG-25 obsahují 9,3 mol
 30 reaktivních aminoskupin na mol proteinu, stanoveno spektroskopickou titrací trinitrobenzen-sulfonovou kyselinou (TNBS) za použití metody popsané Habeebem, Anal. Biochem., 14:328-336 (1966). Podobně spojené frakce PEG-32 obsahují 10,4 mol a nemodifikovaný krysí SCF¹⁻¹⁶⁴ obsahuje 13,7 mol reaktivních aminoskupin na mol proteinu. Průměrně 3,3 (13,7 minus 10,4) aminoskupin krysího SCF¹⁻¹⁶⁴ ve spojené frakci PEG-32 bylo modifikováno reakcí s SS-MPEG.
 35 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
 40 (Gibco Dulbecco fosfátem pufovaný salinický roztok bez CaCl₂ a MgCl₂) 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.

45

Příklad 13

Exprese receptoru SCF na leukemických blastech

- 50 Leukoblasty byly získány z periferní krve pacienta se smíšenou leukemií. Buňky byly čištěny odstředováním gradientovou hustotou a potlačením adheze. Lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ 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 70 000 receptorů/buňka.

5 Příklad 14

Aktivita kryšho SCF na raných lymfoidních prekurzorech

- 10 Schopnost rekombinantního kryšho SCF¹⁻¹⁶⁴ (rrSCF¹⁻¹⁶⁴), 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 rrSCF¹⁻¹⁶⁴, obsahují monocyty, neurofily a blastové buňky, zatímco kolonie stimulované samotným IL-7 nebo v kombinaci s rrSCF¹⁻¹⁶⁴ obsahují převážně pre-B buňky. Pre-B buňky charakterizované jako B220⁺, sIg⁻, cμ⁺, byly identifikovány FACS analýzou spojených buněk za použití fluorescenčně značených protilátek k B220 antigenu
- 15 (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
- 20 růstu buněk IL-7, bylo pozorováno synergické zvýšení tvorby kolonií (tabulka 16), indikující stimulující roli rrSCF¹⁻¹⁶⁴ na časných B buněčných progenitorech.

Tabulka 16

25 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 ± 2
	100 ng	7 ± 4
	50 ng	4 ± 2
rhIL-7	200 ng	21 ± 6
	100 ng	18 ± 6
	50 ng	13 ± 6
	25 ng	4 ± 2
rhIL-7	200 ng + rrSCF ¹⁻¹⁶⁴ 200 ng	60 ± 0
	100 ng + 200 ng	48 ± 8
	50 ng + 200 ng	24 ± 10
	25 ng + 200 ng	21 ± 2

¹Počet kolonií na 5 x 10⁴ buněk myší kostní dřeně, které byly umístěny na plotnu.

30

Každá hodnota je průměr ze tří ploten ± stand. odchylka.

Příklad 15

Identifikace receptoru pro SCF

5 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, kódovaného 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 kryšího nebo lidského ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴ podle metod, popsáných 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 myšího c-kitu (monokit–L1) vážou kryší ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴. Malé množství vazby kryšího ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴ bylo detekováno 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. Kryší ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴ se váže stejně jak k lidskému, tak k myšímu c-kitu, zatímco lidský ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴ se váže s nižší aktivitou k myšímu c-kitu (tabulka 17). Tyto údaje jsou v souladu s modelem křížové reaktivity SCF¹⁻¹⁶⁴ mezi druhy. Kryší SCF¹⁻¹⁶⁴ indukuje proliferaci lidské kostní dřeně se specifickou aktivitou stejně jako lidský SCF¹⁻¹⁶⁴, zatímco lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ indukuje proliferaci myších mast buněk se specifickou aktivitou 800krát nižší než kryší 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.

35 Tabulka 17

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

Transfektovaný plazmid	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

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

^b 1,6 nM lidský ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴

^c 1,6 nM lidský ¹²⁵I–SCF¹⁻¹⁶⁴ + 320 nM neznačený lidský SCF¹⁻¹⁶⁴

^d 1,6 nM krysí ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴

^e 1,6 nM krysí ^{125}I -SCF¹⁶⁴ + 320 nM neznačený krysí SCF¹⁻¹⁶⁴

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

5

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 kyselý 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 plazmidy: V19.8 :mckit-LT1, celý myší c-kit; a V19.8:kckit-L1, obsahující ligandovou vazbu plus transmembránovou oblast (amino-kyseliny 1–549) lidského c-kitu.

25 Plazmidy 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 z misky, 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 pětikrát, 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 25 000 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 ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴ (1,6 nM) a nebo bez 200násobného přebytku neznačeného SCF¹⁻¹⁶⁴ ve vázacím pufru, obsahujícím RPMI doplněný 1 % hovězího sérového 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 ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴ od volného ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴. Pelety byly odděleny a membránově napojený ^{125}I -SCF¹⁻¹⁶⁴ byl kvantifikován.

45

Příklad 16

A. Izolace cDNA lidského SCF

50

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 pool(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 DH5α (BRL, Bethesda, MD) buněk elektroporací (Dower a spol., Nucl. Acids Res., 16, 6127–6145 (1988)).

B. Screening cDNA knihovny

Přibližně $2,2 \times 10^5$ primárních transformantů bylo rozděleno do 44 poolů, každý o obsahu asi 5000 individuálních klonů. Plazmidová 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 plazmidové DNA byly štěpeny restrikcí 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 restrikcími enzymy a stanovení nukleotidové sekvence na 5' konci indikují, že dva z těchto tří klonů jsou identické (10–1a a 21–7a). Oba obsahují kódující 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 pDSRα2 hSCF^{1–248}

pDSRα2 hSCF^{1–248} byl generován za použití plazmidů 10–1a (jak je popsáno v příkladu 168) a pGEM3 hSCF^{1–164} následovně: HindIII inzert z pGEM3 hSCF^{1–164} byl transferován do M13mp18. Nukleotidy bezprostředně v protisměru k ATG iniciačnímu kodonu byly vyměněny místně řízenou mutagenézí z ttctctATG na gccgccATG 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 pDSRα2, který byl štěpen HindIII. Tento klon je označen pDSRα2 hSCF^{K1–164}. DNA z pDSRα2 hSCF^{K1–164} byl štěpen XbaI a DNA byla opatřena tupými 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 pDSRα2 hSCF^{K1–164}, tak 10–1a. Tyto DNA byly společně spojeny za vzniku pDSRα2 hSCF^{K1–248}.

45 D. Transfekce a imunoprecipitace COS buněk s pDSRα2 hSCF^{K1–248} DNA

COS–7 (ATCC CRL 1651) buňky byly transfektovány s DNA konstruovanou výše popsaným způsobem. 4×10^6 buněk v 0,8 ml DMEM + 5 % PBS bylo elektroporováno při 1600 V buď 10 µg pDSRα2 hSCF^{K1–248} DNA nebo 10 µg 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 -médium podle modifikace protokolu Yardeny 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
 5 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 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 média z COS/pDSR α 2 hSCF^{K1-248} a COS/pDSR α 2 vektorové kontroly byly imunoprecipitovány spolu se vzorky média ze ^{35}S -značeného
 10 CHO/pDSR α 2 hSCF¹⁻¹⁶⁴ klonu 17 buněk (viz příklad 5) v souladu s modifikací protokolu Yardeny a spol. (EMBO H. 6, 3341–3351, 1987). Jeden ml každého vzorku kondicionovaného média byl zpracován s 10 μl pre-imunního králíčího 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
 15 zkumavce. Vzorky byly inkubovány další jednu hodinu při 4 °C. Imunní komplexy byly peletovány odstředováním při 13 000 x g po 5 minut. Supernatanty byly transferovány do nových zkumavek a inkubovány s 5 μl králíčího polyklonálního antiséra (č. 1381 TB4), čištěného jako v příkladu 1, proti hSCF¹⁻¹⁶² 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
 20 pufrem pro lýzi (0,50 N–deoxycholát, 0,5% NP–40, 50 mM NaCl, 25 Tris pH 8, 3x promývacím pufrem (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 μl 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 13 000 x g po 5 minut a supernatanty byly odstraněny.

25 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 μl imunního komplexu a inkubováno bylo po 3 hodiny při 37 °C. Byl přidán stejný objem 2xPAGE vzorkového pufru a vzorky byly povařeny 3 minuty. Štěpené a neštěpené vzorky byly zpracovány
 30 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
 35 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 2hSCF¹⁻¹⁶⁴. 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 hSCF¹⁻¹⁶⁴ sekretovaným CHO transfektovanými pDSR α 2 hSCF¹⁻¹⁶⁴ (příklad 11). Tato skutečnost silně
 40 naznačuje, že přirozené proteolytické místo uvolňující SCF z buňky je v sousedství amino-kyseliny 164.

Příklad 17

45 Kvarterní strukturní analýza lidského SCF

Při kalibraci filtrační kolony (ACA 54) popsané v příkladu 1 pro čištění SCF z BRL buněčného média se standardy molekulové hmotnosti a při eluci čištěného SCF z jiných kalibrovaných
 50 gelových filtračních kolon je zřejmé, že SCF čištěný z BRL buněčného média se projevuje se zřejmou molekulovou hmotností přibližně 70 000 až 90 000, 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 kryší SCF odvozený z BRL může existovat jako nekovalentně asociovaný dimer za nedenaturačních podmínek. Podobné výsledky platí pro rekombinantní SCF formy (např. kryší a lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ získaný z E.coli, kryší 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 36 000 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.

15 Příklad 18

Izolace klonů cDNA lidského SCF z buněčné linie 5637

A. Konstrukce 5637 cDNA knihovny

20 Celková 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
25 cDNA syntézním kitem za podmínek doporučených dodavatelem. Přibližně 80 mg 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)).

30 B. Screening cDNA knihovny

Přibližně $1,5 \times 10^5$ primárních transformantů bylo rozděleno do 30 poolů, kde každý přibližně obsahoval 5000 individuálních klonů. Plazmidová DNA byla připravena z každého poolu CTAB-DNA srážením, které je popsáno (Del Sal a spol., Biotechniques, 7, 514–519 (1989)).
35 Dva mikrogramy každé plazmidové DNA z poolu byly štěpeny restrikcí NotI a separovány gelovou elektroforézou. Linearizovaná DNA byla transferována na GeneScreen Plus membránu (DuPont) a hybridizována ³²P-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,
40 obsahujících pozitivní signál. Pooly kolonií byly rescreenovány ³²P 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. Velikosti inzertu ze čtyř izolovaných klonů jsou přibližně 5,3 kb. Štěpení restrikcí NotI a nukleotidová analýza 5'-konce klonů prokazuje, že čtyři klony jsou identické. Sekvence této lidské cDNA je uvedena na obr. 44.
45 cDNA na obr. 44 kóduje polypeptid, ve kterém aminokyseliny 149–177 sekvence na obr. 42 jsou nahrazeny jediným Gly zbytkem.

Příklad 19

Vliv SCF na přežití po letální iradiaci

5 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 myši ve všech pokusech a myši byly před každým pokusem zváženy. Myši byly ozářeny 850 rad nebo 950 rad v jedné dávce. Myším byly
 10 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 µg/kg), čištěným z E.coli a modifikovaným přídatkem 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.
 15 Ošetření s krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ bylo provedeno přidáním 200 µg/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
 20 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.

25 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 hladin 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.

30

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). Proto byla
 35 použita dávka ozáření 850 rad s transplantační dávkou 5 % femuru ke studium 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 myši přežívalo 8 dní po ozáření. Ošetření krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ mělo za následek
 40 výrazné zvýšení přežití u více než 90 % myši, které přežívají více než 30 dní (obr. 40). Výsledky, uvedené na obr. 46, představují kompilaci výsledků ze 4 separátních pokusů, kde bylo použito 20 myši jak u kontrolní myši, tak u myši ošetřených krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴. Při vyšších dávkách ozáření, ošetření myši 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 %
 45 femuru, uhynuly 8. den, zatímco přibližně 40 % myši ošetřených krysím PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ přežívalo 20 dní nebo déle. 20 % kontrolních myši s transplantovanými 20 % femuru přežívalo po 20 dní, při ošetření rSCF přežívalo 80 % pokusných zvířat (obr. 47).

Příklad 20

Tvorba monoklonálních protilátek vůči SCF

- 5 8 týdnů staré samice BALB/c myši (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 slezinové buňky fúzovány se sp 2/0 myelomovou linií postupem, popsáným Nowinskim a spol., (Virology 93, 111-116 (1979)).

- 15 Médium, použité pro buněčnou kulturu sp 2/0 a hybridomy, bylo Dulbecco modifikované Eaglovo médium (DMEM), (Gibco, Chagrin Falls, Ohio) doplněné 20 % teplem inaktivovaného fetálního hovězího séra (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 médiu, obsahujícím 10⁻⁴M hypoxanthinu, 4 x 10⁻⁷ aminopterinu a 1,6 x 10⁻⁵M thymidinu, po dobu dvou týdnů, pak kultivovány v médiu, obsahujícím hypoxanthin a thymidin po dva týdny.

- 20 Hybridomy byly screenovány následovně: polystyrenové desky (Costar, Cambridge, MA) byly senzibilizovány 0,25 µg lidského SCF¹⁻¹⁶⁴ (E.coli) v 50 µl 50 mM hydrogenuhličitanového 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 kozi-anti-myši 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.

- 30 Kultury hybridomových buněk, sekretujících protilátku, specifickou pro lidský SCF¹⁻¹⁶⁴ (E.coli), byly testovány ELISA jakož i postupy screeningu hybridomů, na křížové reaktivity 1 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).

- 35 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. září 1990.

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

PATENTOVÉ NÁROKY

5

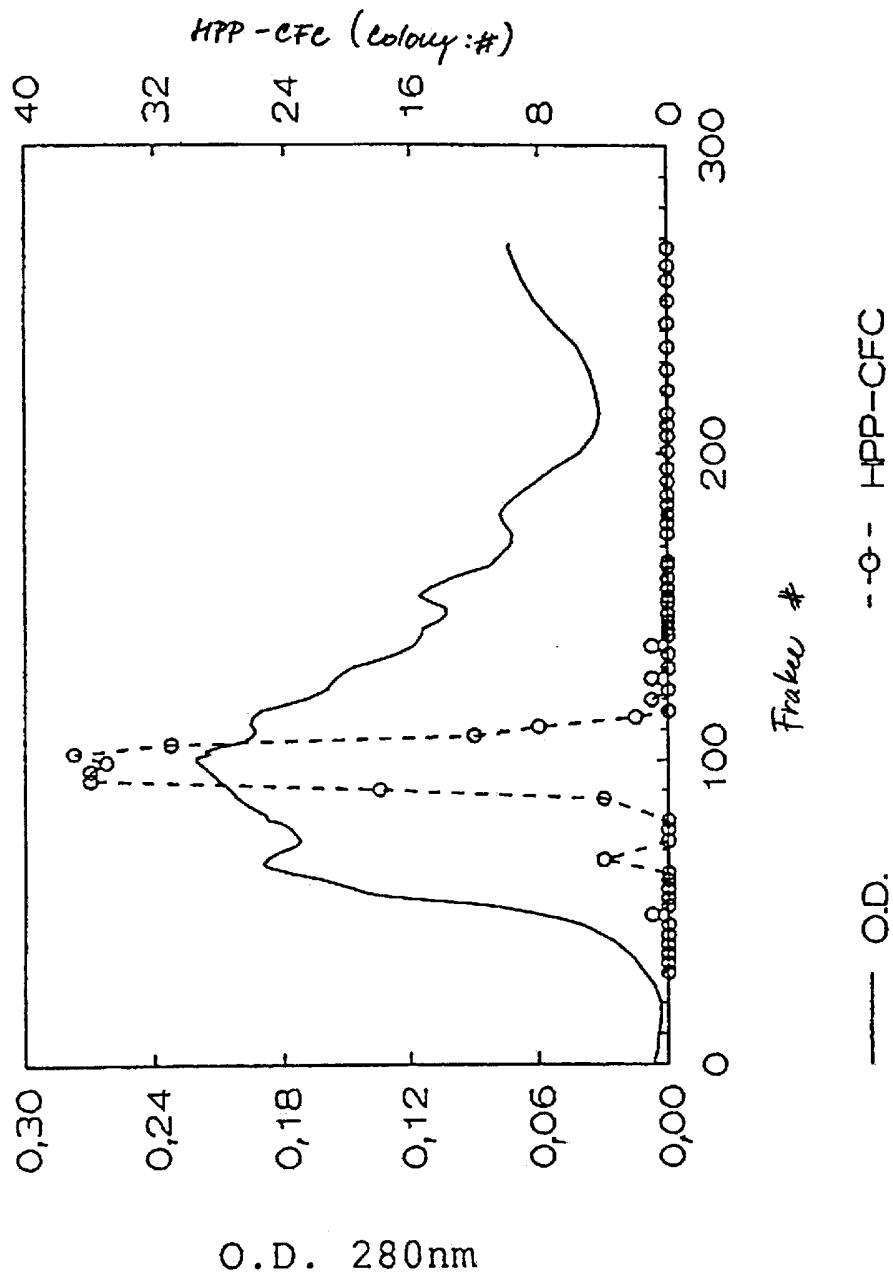
1. Čištěný a izolovaný polypeptid, mající celou nebo částečnou primární strukturu sekvence, uvedené na obr. 42A–C, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci, vykazující hemato-poetickou biologickou vlastnost přirozeně se vyskytujícího faktoru kmenových buněk.
- 10 2. Polypeptid podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 42A–C: 1–248, 1–189, 1–188, 1–185, 1–180, 1–156, 1–141, 1–137, 1–130, 1–164, 2–164, 5–164 a 11–164, popřípadě s methioninovým zbytkem na N-konci.
- 15 3. Polypeptid podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 42A–C: 1–120, 1–110, 1–100, 1–133, 1–127 a 1–123, 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:
 - 20 (a) DNA sekvencí, uvedených na obr. 42A–C, nebo jejich komplementárních řetězců,
 - (b) DNA sekvencí, které za stringentních podmínek hybridizující k DNA sekvencím, definova-ným pod (a), nebo jejich fragmentů, a
 - 25 (c) DNA sekvencí, které nebýt degenerace genetického kódu by hybridizovaly k DNA sekven-cím, definovaným v (a) a (b), přičemž tyto sekvence kódují polypeptid, mající stejnou aminokyselinovou sekvenci.
- 30 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.
- 35 7. DNA sekvence podle nároků 4, 5 nebo 6, obsahující jeden nebo více kodonů, preferovaných pro expresi v kvasinkových buňkách.
8. DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 4, 5 nebo 6, která kóduje expresi methionylo-vého zbytku v N–terminální poloze maturované verze uvedeného polypeptidu.
- 40 9. DNA sekvence podle kteréhokoliv z nároků 4 až 8, kovalentně spojená s detekovatelným značením.
- 45 10. DNA sekvence podle nároku 9, kde značení je radioaktivní značení.
11. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě 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.
- 50 12. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro výrobu léčiva pro hemato-poetickou terapii savce.

13. Použití podle nároku 12 pro výrobu léčiva pro léčbu leukopenie, léčbu trombocytopenie, léčbu anémie, zvýšení příjmu transplantátu kostní dřeně, zvýšení obnovy kostní dřeně při léčbě ozařováním, chemicky nebo chemoterapeuticky indukované aplasie kostní dřeně nebo myelosuprese a citlivosti buněk k chemoterapii.
- 5 14. Použití podle nároku 13 pro výrobu léčiva pro zvýšení počtu buněk schopných transplantace po aspiraci kostní dřeně nebo periferní krevní leukoferesi.
- 10 15. Použití polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro výrobu léčiva pro léčení AIDS, myelofibrosis, myelosklerózy, osteoporózy, metastatického karcinomu, akutní leukemie, mnohotného myelomu, Hodgkinovy choroby, lymfomu, Gaucherovy choroby, Niemann–Pickovy choroby, Letterer–Siwovy choroby, odolné erythroblastické anémie, Di Guglielmova syndromu, kongestivní splenomegalie, Kala azar, sarkoidózy, primární splenické pancytopenie, miliární tuberkulózy, rozseté plísňové choroby, prudké septikémie, malárie, deficiencie vitamínu B₁₂,
15 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.
- 20 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 hematopoetický 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.
25
19. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 17 pro výrobu léčiva, dále obsahujícího alespoň jeden další hematopoetický faktor, vybraný z IL-8, IL-9 a IL-10.
- 30 20. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 17 pro výrobu léčiva, dále obsahujícího alespoň jeden další hematopoetický faktor, vybraný z IL-11 a LIF.

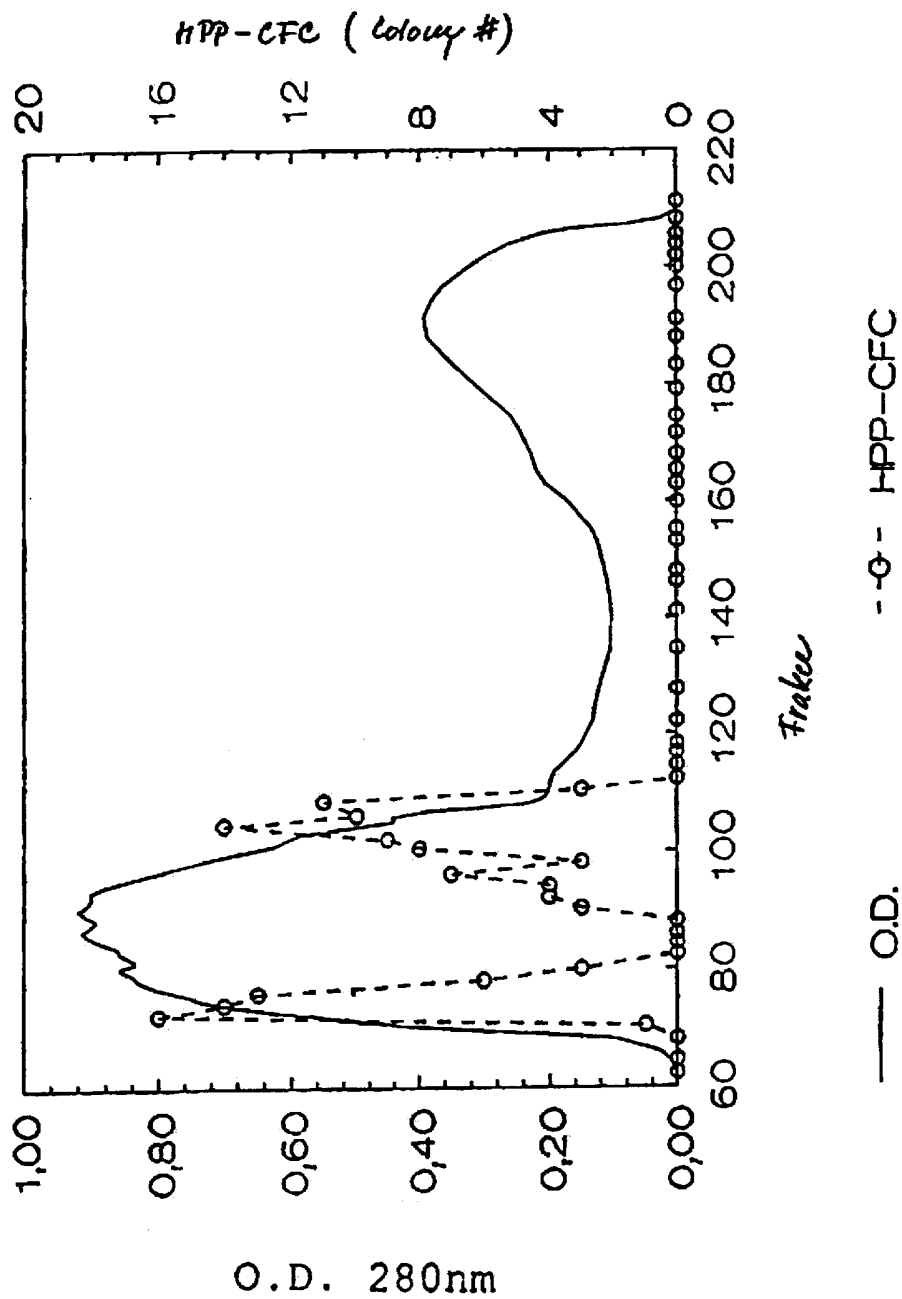
35

81 výkresů

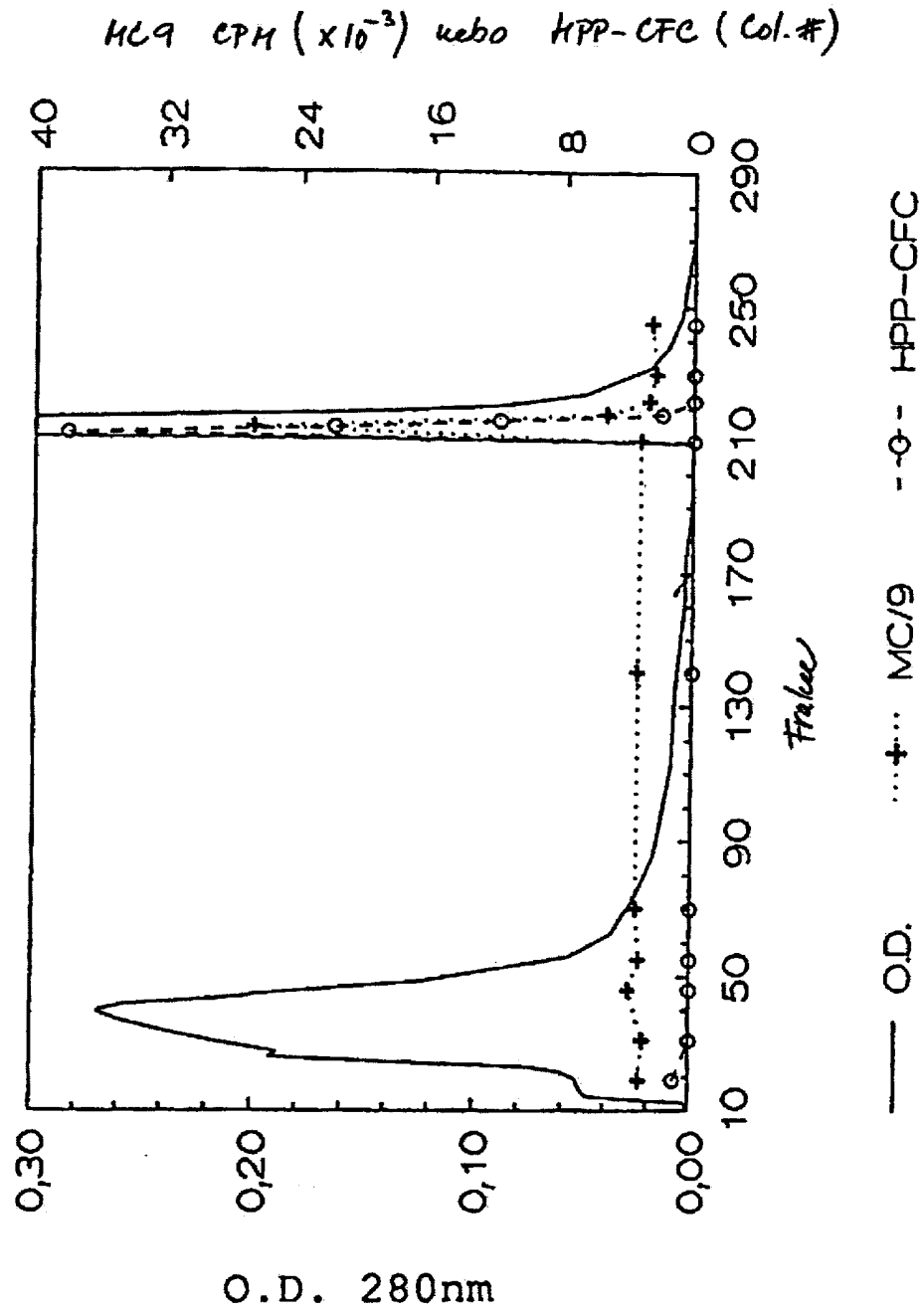
Obr. 1



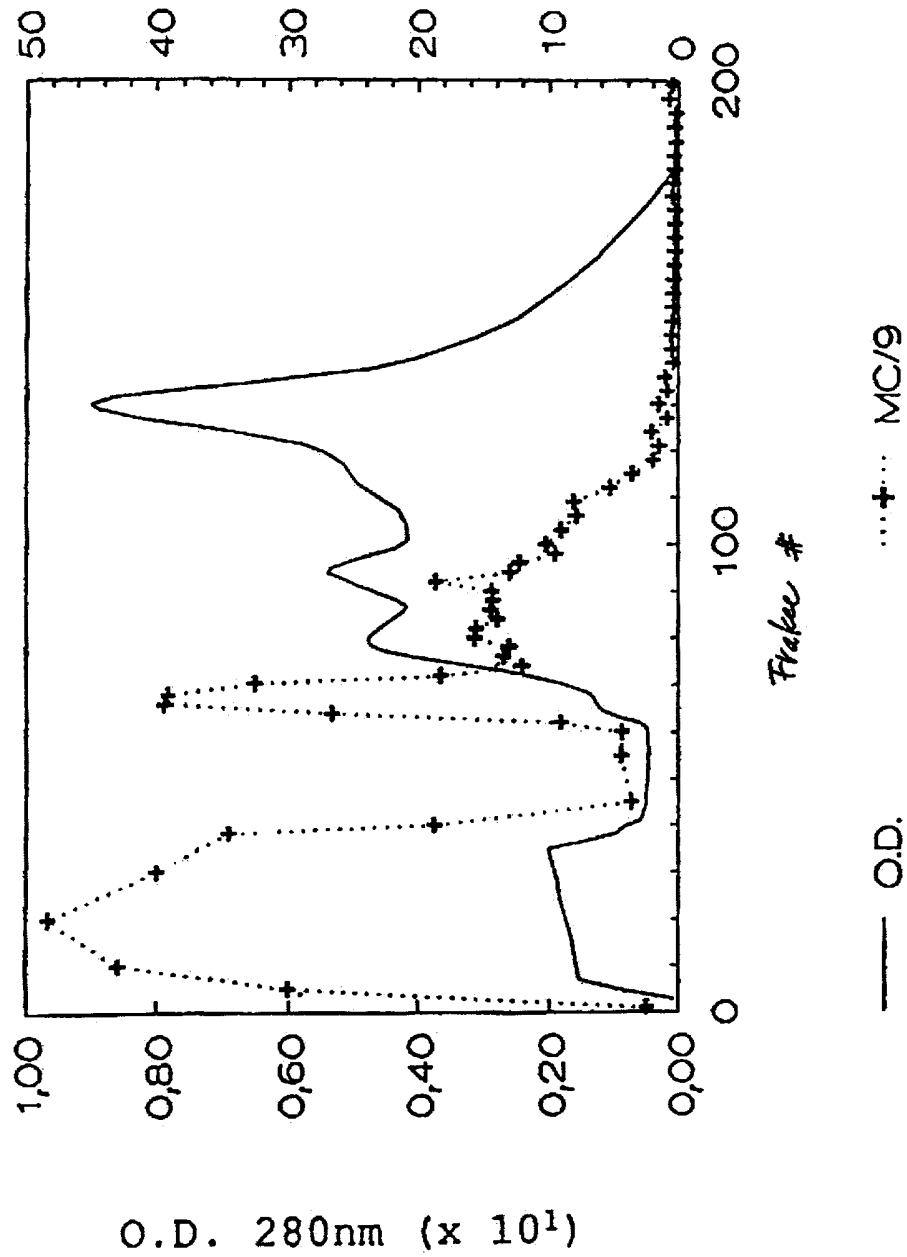
Obr. 2



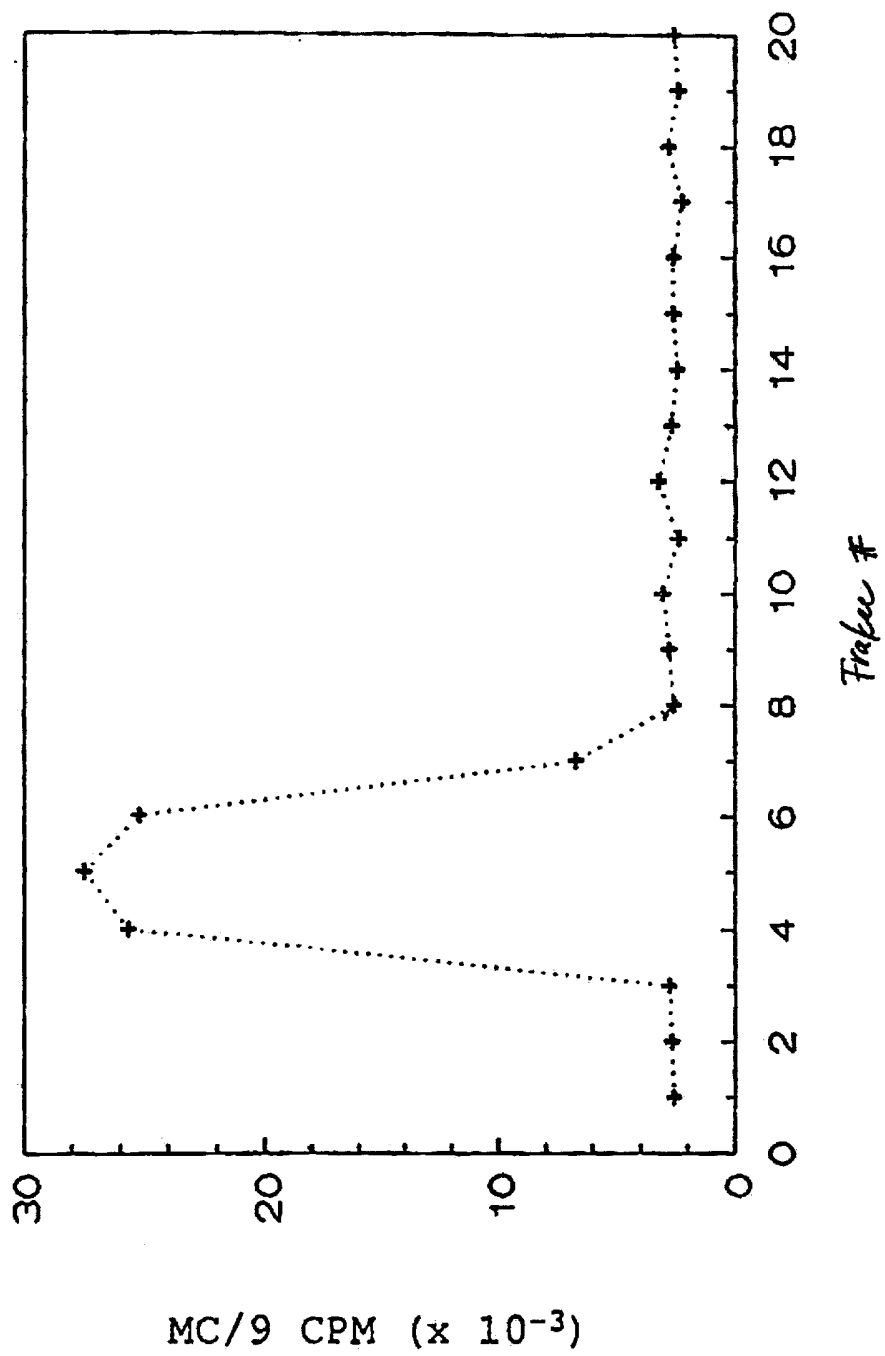
Obr. 3



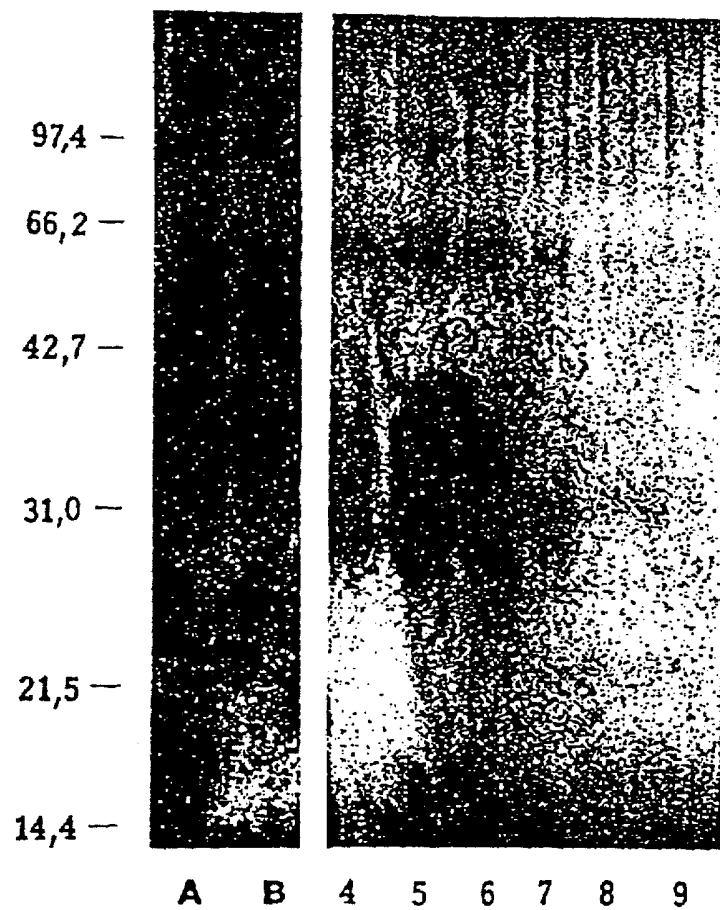
Obr. 4

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

Obr. 5

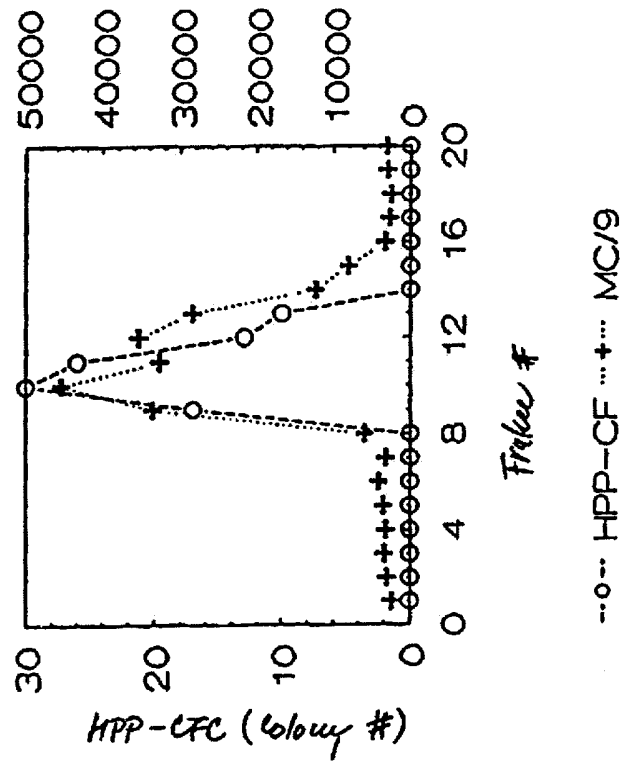


Obr. 6

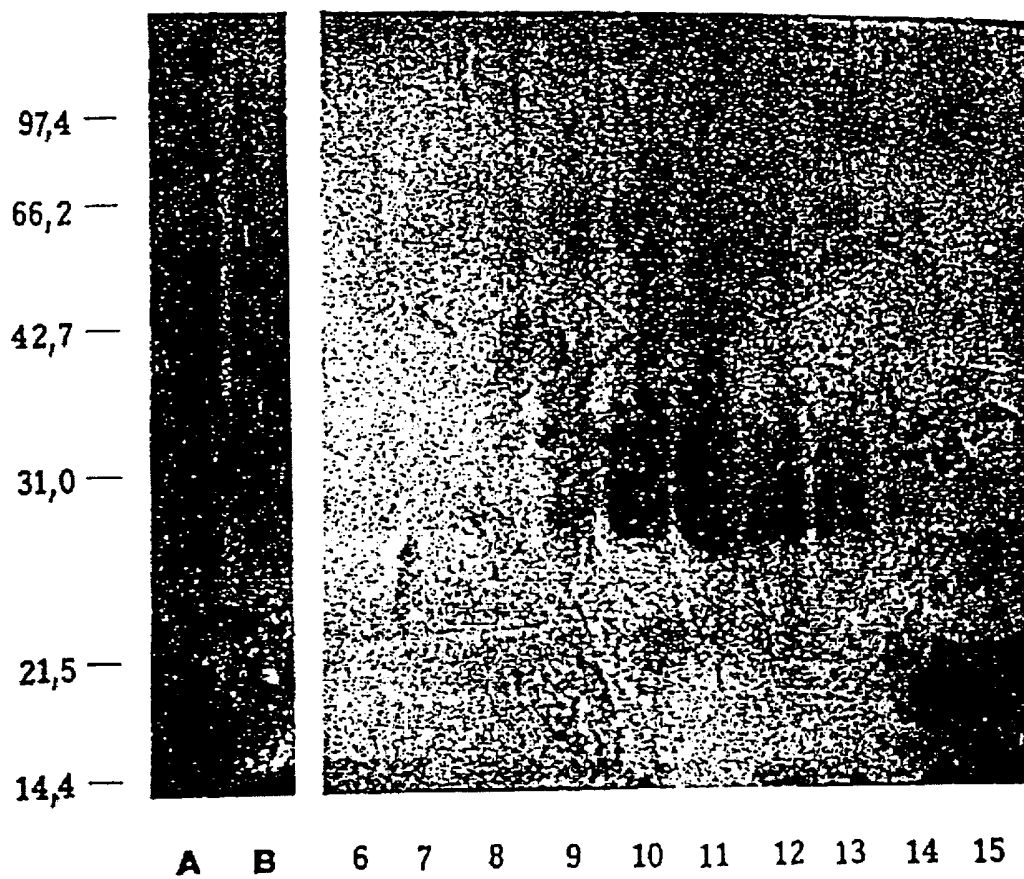


Obr. 7

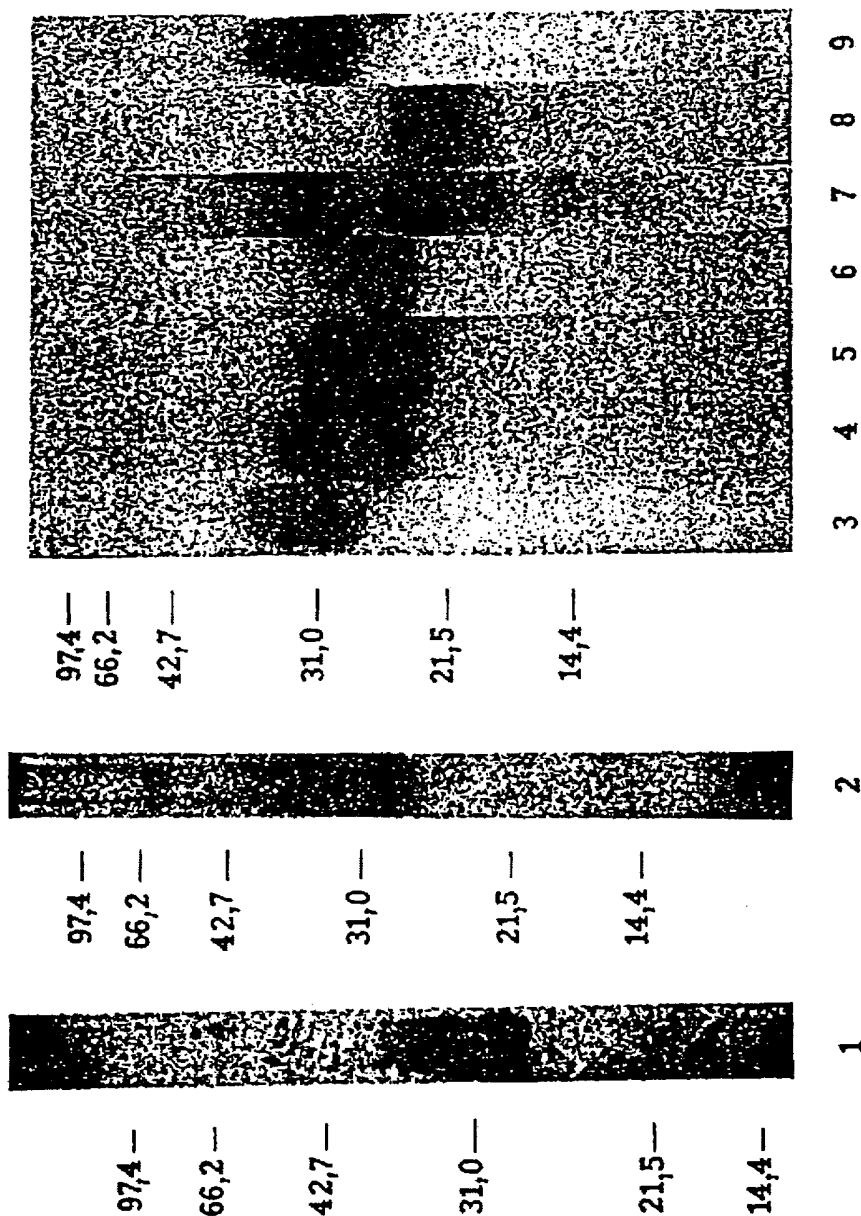
MC/9 CPM



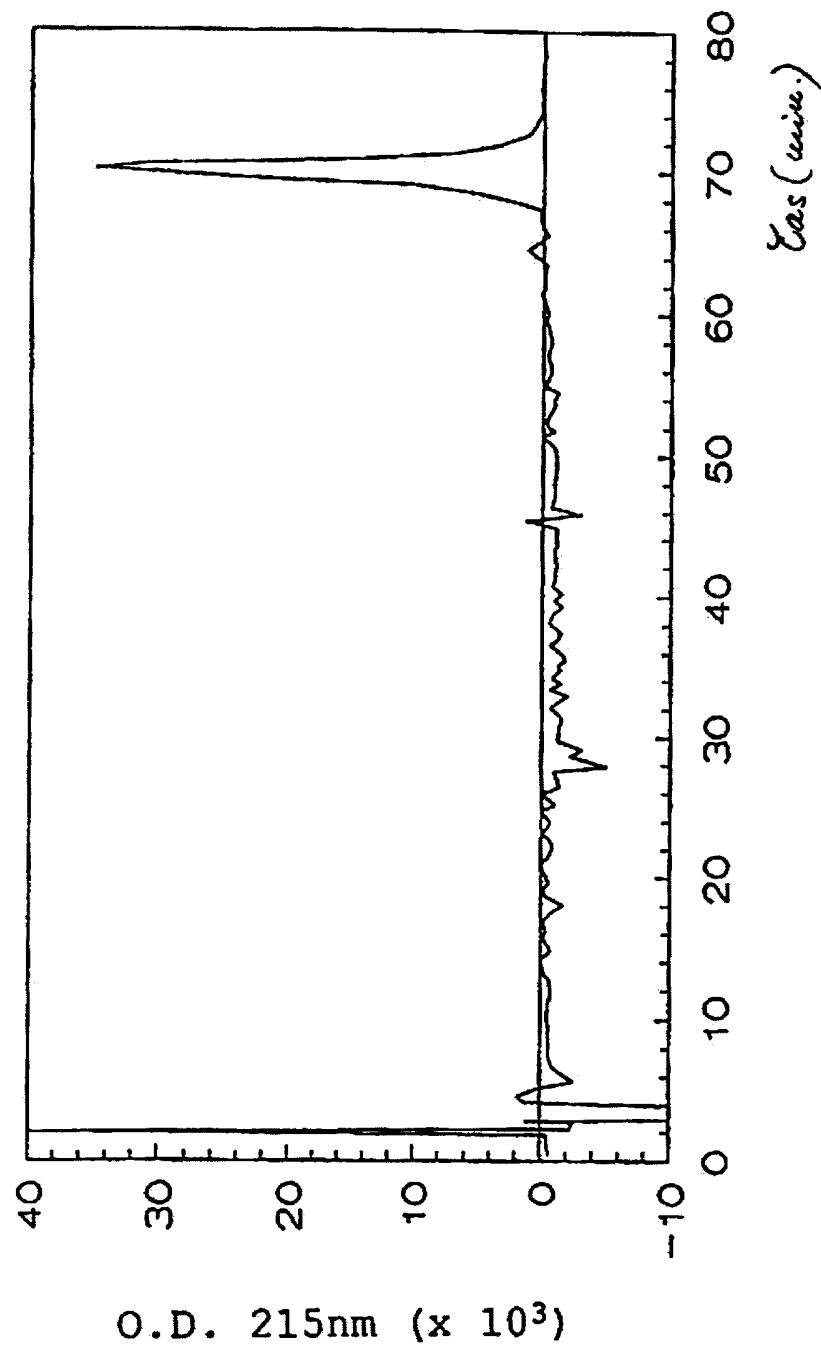
Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10



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

 ----- T-5a -----
 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	ACATTCTTIGGIGCATTCCTCCTCCAT G T G T T	393-368
219-22	AAAACTCCTCIGGIGTAAAT G T T G G	447-425
219-25	GTTTCNGGTTTT 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	GGNGNAACATAAANGGCTT G G T	566-585
223-6	ACCATAAAATCTTTAAICGATC G G C G G	492-470
224-24	GTATTTTCAATAGATCCATTGA	450-471
224-25	CCAACTATGTCGCC	190-202
224-27	GTAGTCAAGCTGACTGATAAG	273-253

Obr. 12A pokrač.

224-28	TAACCAACAATGACTAGGCAA	235-215
225-31	TTCCAGAGTCAGTGC	547-562
227-29	GCGAAGCTTGCCTTTCCCTTATGAAGAAGA	16-35 *
227-30	GCGCCGCGGTTACGGTGGTAAACATGAAGGGCTTTGTGA	586-561 *
228-30	GATAAATGCAAGTGATAATCC	45-65
230-25	GCGGTCGACCCGCGGAACCTTTAAGTCCATGCAACAC	705-685 *
237-19	CACCCGCGGTTATGCAACAGGGGGTAACATAAATGG	569-592 *
237-20	CACCCGCGGTTAGGCTGCAACAGGGGGTAACATAA	572-595 *

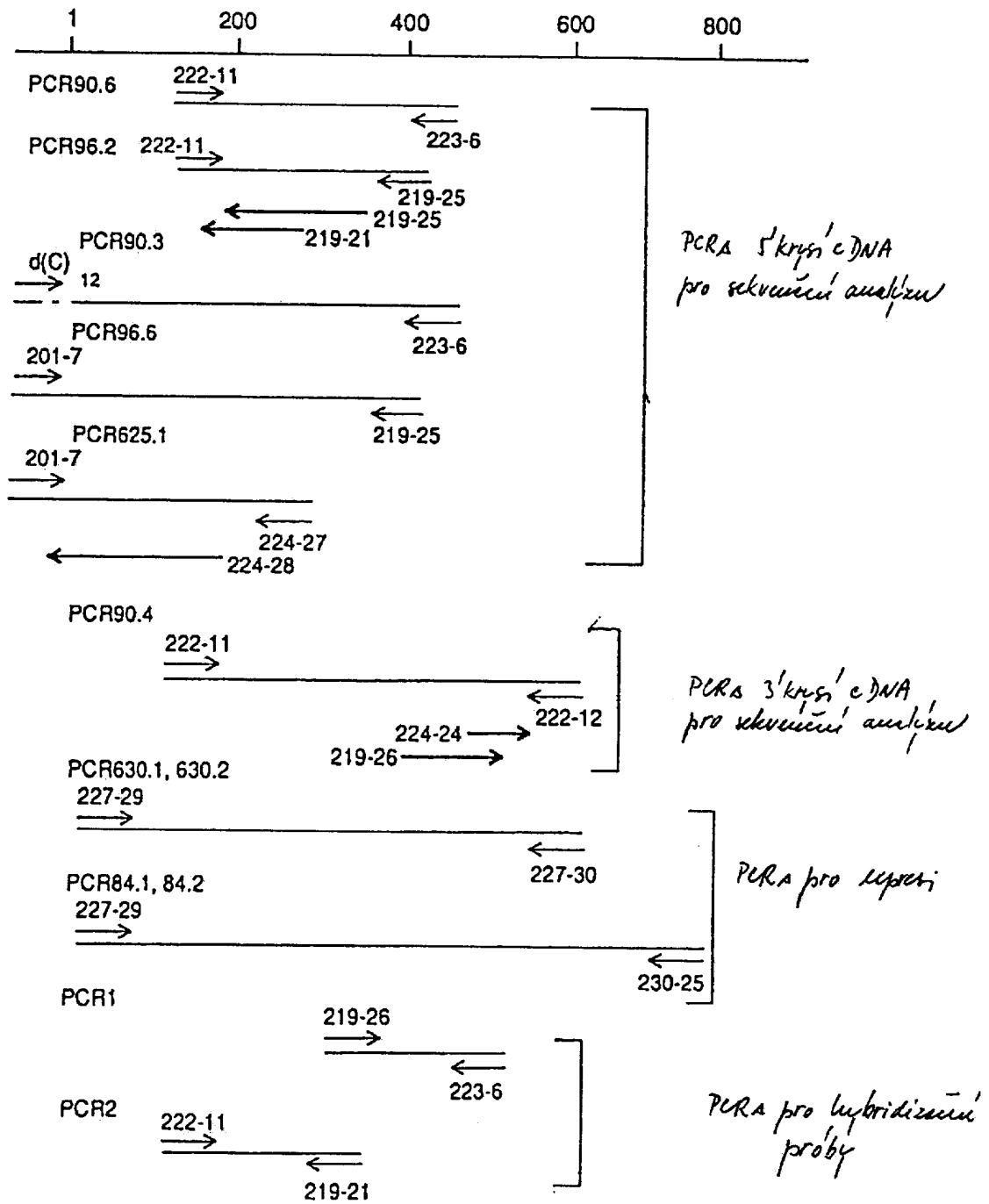
Obr. 12B

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 TGTTTGCTGGATCGCA	153-179
262-13	GGTGTCTAGACTTGTGTCTTCTTCATAAGGA	209-190 *

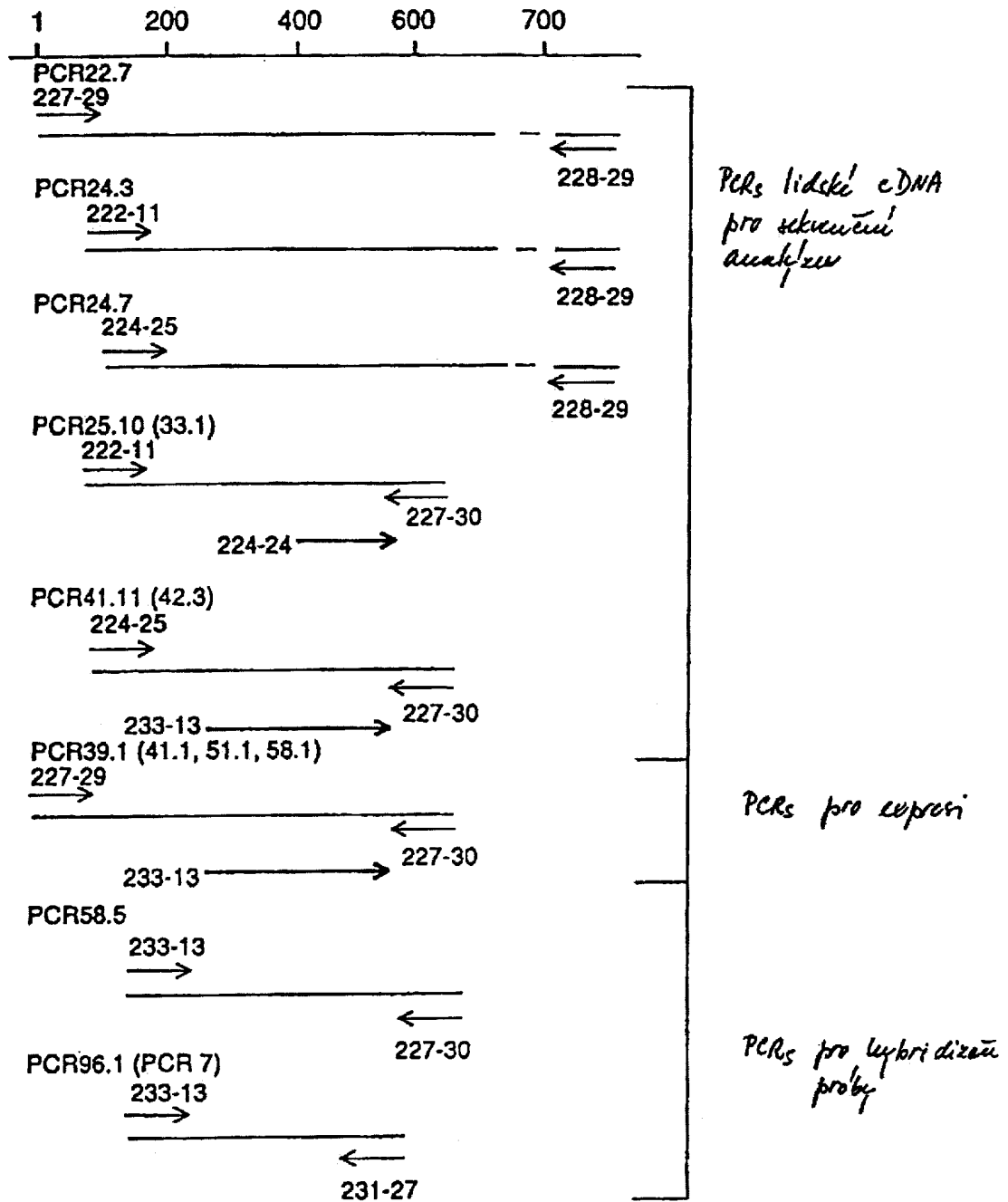
Obr. 12C

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

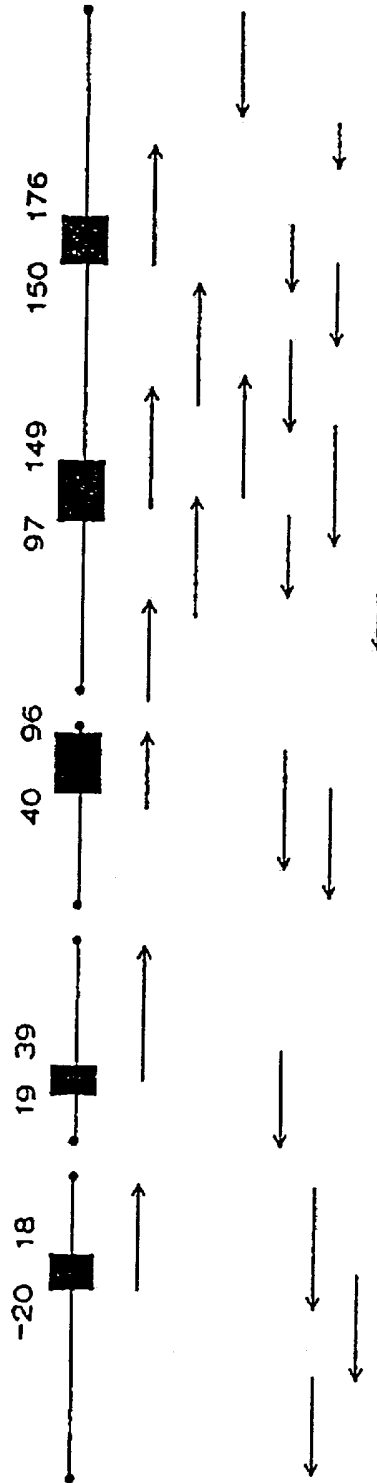
Obr. 13A



Obr.13B



Obr. 14A



Obr. 14B

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

Obr. 14B *pokř. 1*

CAAAACTGGTAAGTAAAGAATGATTTTGGCATCTATAAGTCTTCC 810
 CTGTGCTTGCTGACCACATAGGTTTCAGGGCACTCCCGACAGGAGT 855
 TCCCAGCTTTCTAAGATAAGGAATCACTGTACGAGTCTGAAGTGC 900
 TTCTTCTGGGCAAATGGGAGATGCTTAGGTCATGGAGGGTTTATC 945
 TGTATAACTGGCCCTTTGCACACCAACAAAGTGAAGTGAAGTGGCTT 990
 TTGCCTGTTACCTACTG 1007

TCTCCAGTCCTGGGCATGGTATATACTTAGGCACCCAAGATTGGA 45
 TTTACAACCTCAAGCATTATATATTGGACAACnACGGGGTATGAGA 90
 TATTAATGATATGTCAGGTTGGATGGATGAGTTTTCTCAAGAAAT 135

19

Val

TCTCTTGATTTTACTCACGTTTTTCATTTCTTGGTCTCTGTAGGTG 180

30

AlaAsnLeuProAsnAspTyrMetIleThrLeuAsnTyrValAla
 GCGAATCTTCCAAATGACTATATGATAACCCTCAACTATGTCGCC 225

39

GlyMetAspValLeu

GGGATGGATGTTTTGGTATGTAGTCCACACACTTCTGAGTTGCCT 270

TTTAGTAGCTAATGGGTGACCTGTGCTTATTCACATTGAAGACAT 315

TATTTGCTCTTTGTGCGTTTTTAGATGTTGACCTATAATTTTTCCT 360

TCAAGCTGCTGCTAAGATTATCAGTGAGCATTTTCAGTATGTGTTT 405

TAAGCCTACTCATTAAAAGGAAATGGCTCATCTTAGACGTAGCAA 450

Obr. 14B *pokrač.*

CCGATGTTAATTTTTCCCCAGGCATCTCTCAGAGGGACTTGAATG	495
TTAAAATCATGTTAAATTTTCCTCCTTGGCTATGTTATTTCTCATG	540
GCTATGTTATTCCTATTCGTATTTTCATTTAAAGGGACGGAATATT	585
TATTGTATTTCTGAACTTTTTTCAGGCATGCATCCGGGTCTTTGAA	630
TAAAA	635
CACTAAGACTCCTTCTAGTAATGTTTGTAATCCTGTCTGTATCGA	45
ATGTCTTTGAAAACGCAGTGACTAAGCCATAAATAATCTTCCACA	90
GAACGTCCAGTGGTTCATGAACTTTGTATGTGGGGGTGGGGCAAG	135
AATTGTCTCACTATTGGTCAAGGAAGAGAAGGTAAGGTATGCAAG	180
GGTGGTTTAATCTTCTTCCGTGGAAGGACAAAATCATCTATCATT	225
TCCTCTGATCTCTATGCATTTGTTTGTTTTGAACTGAATCTGACT	270
TGAGCAAGAGTTGGCGTCCTGTGTTCTGAGGAACTCTTTGTCCT	315
GCAGTCAGTGACTAAAAGTGCTGAGAGATCTGAAGAGCACTCTGA	360
ATCTGCCATATTTTTAATAGATGCTTTGTCTTCTCTTTGAATTTC	405
40	50
ProSerHisCysTrpLeuArgAspMetValThrHisLeu	
TTCCAGCCTAGTCATTGTTGGTTACGAGATATGGTAACACACTTA	450
60	
SerValSerLeuThrThrLeuLeuAspLysPheSerAsnIleSer	
TCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTCT	495
70	80
GluGlyLeuSerAsnTyrSerIleIleAspLysLeuGlyLysIle	

Obr. 14B *pokrač.*

GAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAACTTGGGAAAATA	540
90 96	
ValAspAspLeuValAlaCysMetGluGluAsnAlaProLys	
GTGGATGACCTCGTGGCATGTATGGAAGAAAATGCACCTAAGGTA	585
ACTTGGTATTCATCAGAATTATTTTCTTATACT	619
GAGCTCATGATGAGCAATTCACAACCACTTGTAATTCCAGCTCCA	45
GAGGACATTATCCCCTCTTTGGATGCCATAGGAATCTGCTCTCAA	90
ATATGTAGATACCACCTCTGCCACCTCAGCACATACATACACATA	135
ATTAAAAAATAGAAACATTAAAGGAGTTCCAATCAATCCTTATTC	180
TTTTCTGTATTCAGTATGCCCAGATGTAAATTCTAGGAATATGTT	225
TTAAAGGCTAATTCTTATTTTGTAATAAGCAGCTTTAAAATTCTT	270
AATTGTTTTTTTCGGGTCACCTTATTGTCCTATTGCCACGACATTG	315
TCCTGTCCCATTGTCTGTTATTCCTTCTGTTTTGTTTATTGTTCC	360
CTAGTTACTTTGATCATGAGATTGACCTGTTACCCGTTGTTATTC	405
TCTGTAGCCATTTTGAGTTGTGTCTATTAGAACAGCTGTTAAATT	450
ACTTGAATCATTGAGGACATAGTCAATAATCTATTATGCTGATCC	495
AGTCAAGTCTATGAGTTATTTGAAAAC TAGAATCTTTGTTAATTA	540
97	
AsnValLys	
TTTGTTTGCTTGTTTGTTTGTTTATTATTTGTCTAGAATGTAAAA	585
100 110	
GluSerLeuLysLysProGluThrArgAsnPheThrProGluGlu	

Obr. 14B *pokř. 4*

GAATCACTGAAGAAGCCAGAACTAGAACTTTACTCCTGAAGAA	630
120	
PhePheSerIlePheAsnArgSerIleAspAlaPheLysAspPhe	
TTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTC	675
130	140
MetValAlaSerAspThrSerAspCysValLeuSerSerThrLeu	
ATGGTGGCATCTGACACTAGTGATTGTGTGCTCTCTTCAACATTA	720
148	
GlyProGluLysA	
GGTCCTGAGAAAGGTAAGGCTTTTAAGCATTTCTTGTTTAAATGT	765
ACATAGAAAGCCTGAAC TTCTGTAAGCCTCTACTGCTGAATCAAC	810
TAAATGTGTTGCTGTAGAAAGAACGTGTGGGTTTTTCTGATAAAA	855
ACAAAAAGCAAATATCAATGACTACCAATGATTATTATCTAGCTT	900
GAGAGATATGCCCTAAGACAGCGATTCTCGATATTTCTAAATTAA	945
AGAATTGTGTGATGGTGGCTCACATATTTTCTAACTGTGATATTT	990
GCCAGGAGAGTAGAATAATGTTATTCTTCATCCCCAGAATTCCTA	1035
AGATTTACAGTCTCATGTCTTTTCCATAAGGTTCAAACCTCTGAGA	1080
CTTGAGTTCTGAGCCTCAGCAGGTCATTCTGAATCCCCACTCTCC	1125
CCGAGCTGGGTCCCTATGGGGGAAC TAACTTCATTGCTTTCTTTT	1170
AAAACATGACGAGTTACCAACAGCTCCTCGCTATTATAAACATGT	1215
TCCTAAGCATGTCTGTGCATGCATAAGCCTTCACTCTACAAGAC	1260
AGTTATGGTGTATCGCTTGACAAACTGAGCAGCCAAGCTGAGTA	1305
TGAAATAATAATCTAGACTTGGGAGGCAGACCCAGCACCTACTGT	1350
GATATTGCACTTCGCCTTTGGGGGACTCTATGATTCAAAAGTTCA	1395

Obr. 14B *pkc.5*

	150	
	spSerArgV	
CCATGTAACACTGACACATTATTGCTTTCTATTTAGATTCCAGAG		1440
	160	
alSerValThrLysProPheMetLeuProProValAlaAlaSerS		
TCAGTGTCAAAAACCATTTATGTTACCCCTGTtGCAGCCAGTT		1485
	170	176
erLeuArgAsnAspSerSerSerSerAsn		
CCCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACACATATC		1530
TGATTTACTGCATGCATGGCTCCAAGTATCCTCTATAGGAGTGTT		1575
GCATGGACTTAAAGTTTATAAATCACTACTAATAATGCTGTTCTG		1620
TCACTGTTATTTCCTTGTATGGGCTTCCTGACAATTAAATATCTGG		1665
TTTGTAGAATCGGATCTCCTTAGAGGTTAAGATGACCATGACAAA		1710
ATTAGGCCAATCAACTTTCTGCGAAGGTTATTTTAAATAAGGCAC		1755
GAAATTAATTGAAGGAAAAAAAAAATACAAGCAAGGCCTTATTTTG		1800
AATCATGGTAGGCTTAAAATAGACTTTGTGGAGAATGTCCCTGAT		1845
CAAAGTGGAGTTTTTCAGATTTCAAGTGCATGTGCTAACTCTCCAC		1890
AATGTCAAGGCTATTTTCAGTTTTGTGTCTCCATATTTACTACTG		1935
CATGTTTGGAATTTGCTGATGCTGTTAGATTACCTAAGAATGTA		1980
TGTTGAAGAAGAATGGACTTCTTTCCCTAAAATTTCTGTCCTCTT		2025
TGcCCAAGAACCCAcGTTCCCTGGAAGACTATCTTATTTTCATGTC		2070
TGTGCAATGATCATTATAAAGATTATTGAATATACTGGAATACT		2115
CTGGTTTCTGTTTTTACAGATTCATAATAGCTTATTCAGTCTTTA		2160
AAGAAAGTTCTCTGAAGTCCATGCTTTAGAATGTTTCTCTATCAA		2205

Obr. 14B *pokrač.*

AACTTGACCTGGACCTTAAATAAAGCTATATTTAGTCTTTTTATC	2250
CCTGAAAAATATATTTACAGTGTAGACATTTGATATACATCTAA	2295
GGGAAGGATGCTGCCAGAATGCTCGGGCTGGCAGTCTACAAAGTC	2340
CACTGCTCTCAGGATGGACTTCTGAAAGCGGAAATTGTGAACTGC	2385
ATGCATATAACATATCAGATCCTCGAGC	2413

Obr. 14C

-25 -20
 M K K T Q T W I I T C I
 CTGGATCGCAGCGCTGCCTTTCCCTTATGAAGAAGACACAAACTTGGATTATCACTTGCAT 60

 -10 1
 Y L Q L L L F N P L V K T Q E I C R N P
 TTATCTTCAACTGCTCCTATTAAATCCTCTCTCGTCAAAACTCAGGAGATCTGCAGGAATCC 120

 10 20
 V T D N V K D I T K L V A N L P N D Y M
 TGTGACTGATAATGTAAAGACATTACAAAACTGGTGGCGAATCTTCCAAATGACTATAT 180

 30 40
 I T L N Y V A G M D V L P S H C W L R D
 GATAACCCCTCAACTATGTGCGCGGGATGGATGTTTTCCTAGTCATTTGTTGTTACGAGA 240

 50 60
 M V T H L S V S L T T L L D K F S N I S
 TATGGTAACACACTTATCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTCAATATTTC 300

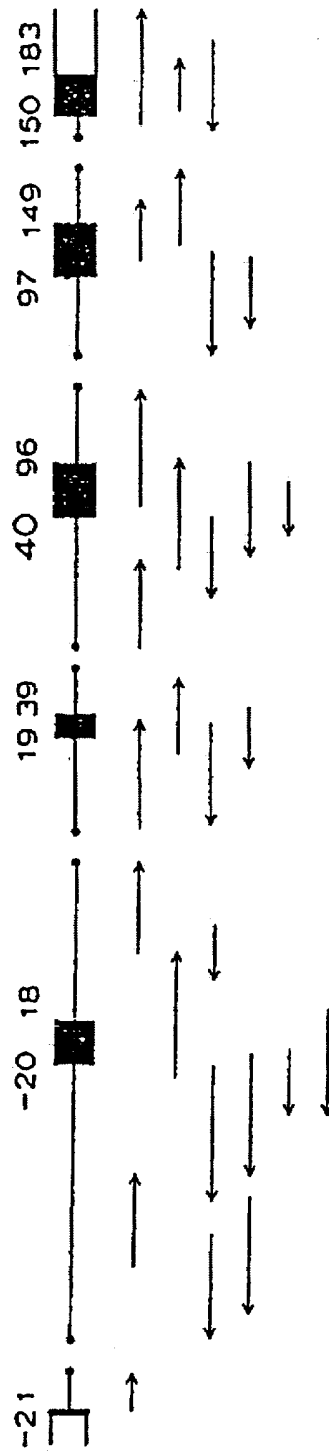
 70 80
 E G L S N Y S I I D K L G K I V D D L V
 TGAAGGCTTGAGTAATTATTCATCATAGACAAACTTGGGAAAATAGTGGATGACCTCGT 360

 90 100
 A C M E E N A P K N V K E S L K K P E T
 GGCATGTATGGAAGAAAATGCACCTAAGATGTAAAGAATCACTGAAGAAGCCAGAAC 420

Obr. 14C *patřo.*

110
 R N F T P E E F S I F N R S I D A F K
 TAGAACTTTACTCCTGAAGAATTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCCTTCAA 480
 120
 130
 D F M V A S D T S D C V L S S T L G P E
 GGACTTCATGGTGGCATCTGACACTAGTGATTGTGTGCTCTCTTCAACATTAGGTCCTGA 540
 140
 150
 K D S R V S V T K P F M L P P V A A S S
 GAAAGATTCAGAGTCAGTGTCAAAAACCAATTATGTACCCCTGTTCAGCCAGTTC 600
 160
 170
 L R N D S S S S N S K Y T Y L I Y C M H
 CCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACACATATCTGATTACTGCATGCA 660
 180
 190 193
 G S K Y P L
 TGGCTCCAAGTATCCTCTATAGGAGTGTTCATGGACTTAAGTT 705

Obr. 15A



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
TGCTACAAGTTTATTCCTAATTGCCATTGGGAAATTGGCTGAAGA	540
AAGTTTTTAACAAAAGTTAACAATATTGTCATTGAGAGAATAATT	585
CAAAATGGATTTTAACTAAAAGCTTTTAAAAACTTTGGTGAGCAT	630
AGCTTGAATGCGTAATATTTAATTGCATTTAAGCCAATAACATAT	675

Obr. 15B *pokrác.*

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

Obr. 15B *pokrač. 11**Intervencijní sekvence a přechodové dílce*

GAATTC	CAAGATCACAGGTGGAAGCTGAAATTCAGATCATGTTTC	45
CAAAACTCAGTAGGTTATACCTAGCCAGGCATAACTGAATTTGGA	90	
GTCTAAAAGATCTGTATTATCACTTTTTTTATTTTGAAGGATGCCT	135	
TTTGATTACAGAGGGAAATCAAGGATTAAAAATCAATATACATGT	180	
AAATATTGAAATTCATTGGTAACTTTAAAAAGCACACAGTTTTG	225	
TGTGCTTTTCTCCAAAGCACTACAAATATGATTAATTGATGTATA	270	

19

ValAlaA

AGAATTTTCTTATGGAATTTTTTTTTTTTGTCTCTGTAGGTGGCAA	315
--	-----

30

snLeuProLysAspTyrMetIleThrLeuLysTyrValProGlyM	
ATCTTCCAAAAGACTACATGATAACCCTCAAATATGTCCCCGGGA	360

39

etAspValLeu

TGGATGTTTTGGTATGTAAACTACATTTCTGAGTTTCATTTTAGT	405
AGCTCATAGAAGAAATGGGATCATTCATATTGAGATAGTACACTA	450
GCTGCTATTTAGGAGCTTGCTTATTGTCAGGATTTGAAGAATTTA	495
TCTTTGGAATTTGACTTGCAGGCTTTTTTTTCCCCCTCTT	535

Intervencijní sekvence a přechodové dílce

CCTGTTACAAGAGTCCCTCCTCCTATTACAATAGTCCCTCCTCCT	45
CCTGTCACACTAGTCCCTTCTCTTCTGTTACAATAACCCCTGTC	90

Obr. 15B *pokrač.*

CTCCTATTACAACATTTTAAGTAATGTAATATTAATTTTAAAAAT	135
CTGGCCAGGCACGGTGGTTCATGCTTGTAAATCCCAGCACATTGGG	180
AAGCTGAGACGGGTGGATCATTGAGGTCAGGAAGTTTGAGACAG	225
CCTGGCCAACATGGTGAACTTCCTCTCTACTAAAAATAAAAAAG	270
TAGCCAGGCATGGTGGCAGGCACTTGTAATCTGAGCTACTCGAGA	315
GGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAGTAACTAAAACGATAGCTTTG	360
AAGAGTACTCCGAGTTTTATGGCACTTACTTATTAAATAGCTGT	405
40	
ProSerHisCysTrpIleS	
TTTGTCTCTTTTTTCATATCTTGCAGCCAAGTCATTGTTGGATAA	450
50 60	
erGluMetValValGlnLeuSerAspSerLeuThrAspLeuLeuA	
GCGAGATGGTAGTACAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGG	495
70	
spLysPheSerAsnIleSerGluGlyLeuSerAsnTyrSerIleI	
ACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATCCATCA	540
80 90	
leAspLysLeuValAsnIleValAspAspLeuValGluCysValL	
TAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCGTGA	585
96	
ysGluAsnSerSerLys	
AAGAAAACATCTAAGGTAACCTTGTGTTTCATTGGGATTATTTT	630
TCATTACGCTTCTCTAAAAACCCATGCTTCTTGGTGCTGTTGGGG	675
AAAATGAGGCACCTTTATTTATGATATTTTGATTGTATAAACTTC	720
AAATTTAAAAATCTTGTTTCAGATGAGCAAAGAAAACAAGTATTTG	765
CAGTTATACTGCAATACTGAAGTGCACATTC	796

Obr. 15B *pokrač.**Intervenční sekvenca a uspořádání delce*

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

Obr. 15B pokrač. 5
Intervencijska sekvenca s uvoznim delom

CTCTATAACTCATACAAATCACCATATAACACTGACACATTATTG	45
150 160	
spSerArgValSerValThrLysProPheMetL	
CTTTCTATTTAGATTCCAGAGTCAGTGTACAAAACCATTTATGT	90
170	
euProProValAlaAlaSerSerLeuArgAsnAspSerSerSerS	
TACCCCTGTTGCAGCCAGCTCCCTTAGGAATGACAGCAGTAGCA	135
176	
erAsnA	
GTAATAGTAAGTACATATATCTGATTTAATGCATGCATGGCTCCA	180
ATTAGCACCTATAGGAGTATTGCATGGGCTTTCAAGGAACTTCT	225
ACATTTATTATTATTGATACTGTTCTGTTACTGTTATTCCTTTTA	270
TGGTCTTCTTGAGACTTAAGTTTGTAGAATTAAATTTCCCTAGAG	315
CTGGAGATAATGTTTAGAGAATTAGGCCAATAAATTT	352

Obr. 15C

```

-25      -20
      M K K T Q T W I L T C I Y L Q
AAGCTTGCCTTTTCCTTATGAAGAAGACACAAACTTGGATTCTCACTTGCAATTATCTTCAG 61

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

      20
      N V K D V T K L V A N L P K D Y M I T L
AATGTAAAGACGTCACCTAAATTGGTGGCAAAATCTTCCAAAAGACTACATGATACCCCTC 181

      40
      K Y V P G M D V L P S H C W I S E M V V
AAATAATGTCCTCCCGGATGGATGTTTTCSCCAAGTCATTTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTA 241

      60
      Q L S D S L T D L L D K F S N I S E G L
CAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTG 301

      80
      S N Y S I I D K L V N I V D D L V E C V
AGTAATTATTCCATCATAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCCTG 361

      100
      K E N S S K D L K K S F K S P E P R L F
AAAGAAAACCTCATCTAAGGATCTAAAAAATCATTTCAAGAGCCCAAGAACCCAGGCTCTTT 421

```

obr. 15C *pokrač.*

120
 T P E E F F R I F N R S I D A F K D F V 130
 ACTCCTGAAGAATCTTTAGAAATTTTAAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTTGTA 481

 140
 V A S E T S D C V V S S T L S P E K D S 150
 GTGGCATCTGAAACTAGTAGTGTGTGGTTTCTTCAACATTAAAGTCCCTGAGAAAGATTCC 541

 160
 R V S V T K P F M L P P V A A S S L R N 170
 AGAGTCAGTGTCACAAAACCATTATGTGTACCCCTGTGTCAGCCAGCTCCCTTAGGAAT 601

 180 183
 D S S S S N S K Y I Y L I
 GACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACATATATCTGATTTAATGCATGCATGGCTCCAAT 661
 TAGCACCTATAGGAGTATTGCATGGGCTTTCAAGGAAACTTCTACATTATTATTGA 721
 TACTGTTCTGTACTGTTATTCCCTTTTATGGTCTTCTTGAGACTTAAGTTGTAGAATTA 781
 AATTCCCTAGAGCTGGAGATAATGTTTAGAGAAATTAGG 820

Obr. 16A

-25		1		25
MKKTQTWILT	CIYLOLLEN	PLVKTGICR	NRVTNNVKDV	TKLVANLPKD
MKKTQTWILT	CIYLOLLEN	PLVKTGICR	NRVTNNVKDV	TKLVANLPKD
MKKTQTWIIIT	CIYLOLLEN	PLVKTGICG	KRVTDNDVKDI	TKLVANLPKD
MKKTQTWIIIT	CIYLOLLEN	PLVKTGICG	NPVTDNVKDI	TKLVANLPND
MKKTQTWIIIT	CIYLOLLEN	PLVKTQEICR	NPVTDNVKDI	TKLVANLPND
MKKTQTWIIIT	CIYLOLLEN	PLVKT.gicr	nrVTdnVKDV	TKLVANLPKD
				75
YMITLKYPG	MDVLP SHCWI	SEMVVQLSDS	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
YMITLKYPG	MDVLP SHCWI	SEMVVQLSDS	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
YKIALKYPG	MDVLP SHCWI	SVMVEQLSVS	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
YMITLNYVAG	MDVLP SHCWL	RDMVIQLSLS	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
YMITLNYVAG	MDVLP SHCWL	RDMVTHLSVS	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
YmitLkYVpG	MDVLP SHCWi	s.MVVqLS.S	LTDLDDKFSN	ISEGLSNYSI
				125
IDKLVNIVDD	LVECVKENSS	KDLKKSEKSP	EPRLFTPEEF	FRIFNRSIDA
IDKLVNIVDD	LVECVKENSS	KDLKKSEKSP	EPRLFTPEEF	FRIFNRSIDA
IDKLVKIVDD	LVECTEGYSF	ENVKKAPKSP	ELRLFTPEEF	FRIFNRSIDA
IDKLGKIVDD	LVLCEENAP	KNIKESPKRP	ETRSFTPEEF	FSIFNRSIDA
IDKLGKIVDD	LVACMEENAP	KNVKESLKKP	ETRNFTPEEF	FSIFNRSIDA
IDKLVkIVDD	LveC.eens.	kn.Kks.Ksp	E.RLFTPEEF	FrIFNRSIDA

Obr.16B

174

FKDF.VVASE TSDCVVSS TL SPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
 FKDF.AVASE TSDCVVSS TL SPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
 FKDL ET LASK SSECVVSS TL SPD KDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
 FKDF.MVASD TSDCVLSS TL GPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
 FKDF.MVASD TSDCVLSS TL GPEKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS
 FKDF.mVAS. tSdCVVSS TL sPeKDSRVSV TKPFMLPPVA ASSLRNDSSS

224

SNRKAKNPPG DSSLHWAAMA LPALFSLIIG FAFGALYWKK RQPSLTRA VE

SN

SNRKASNSIG DSNLQWAAMA LPAFFSLVIG FAFGALYWKK KQPNL

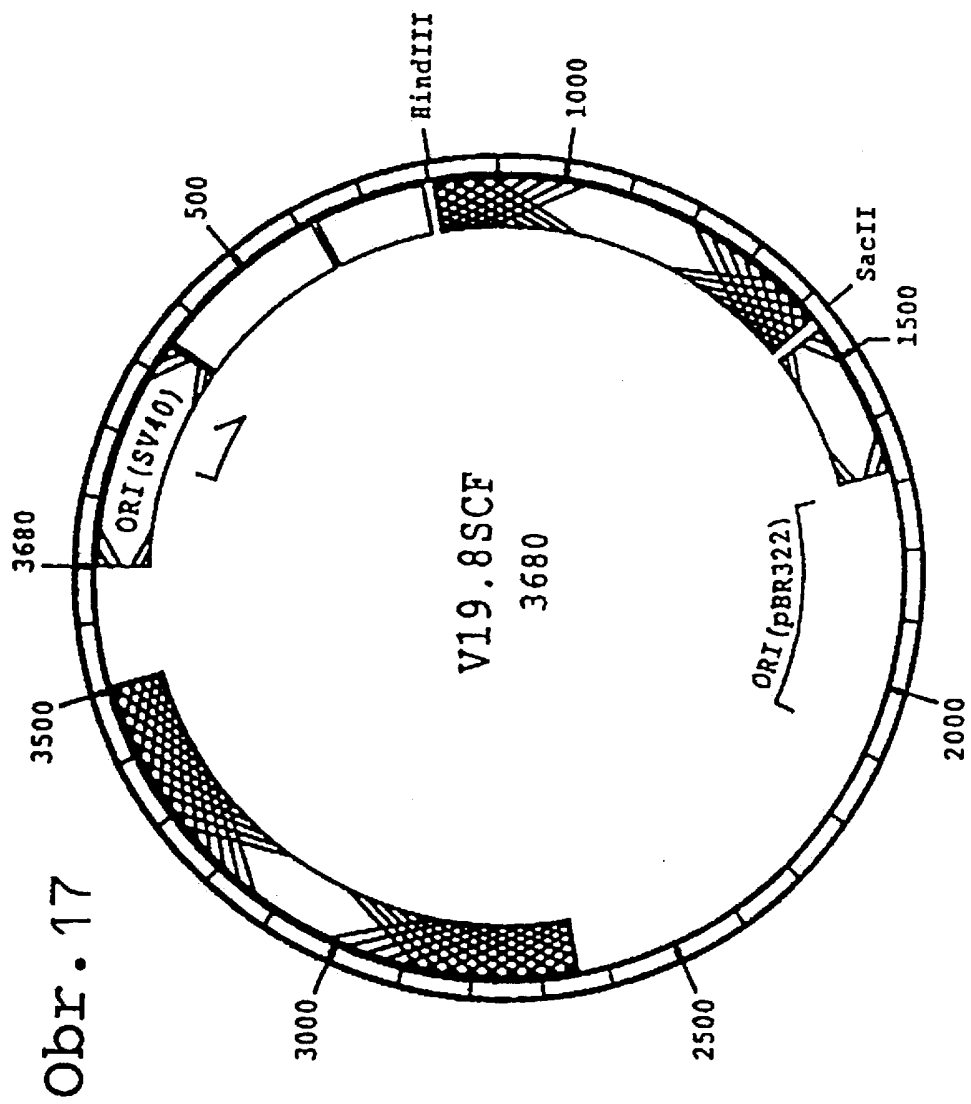
SN

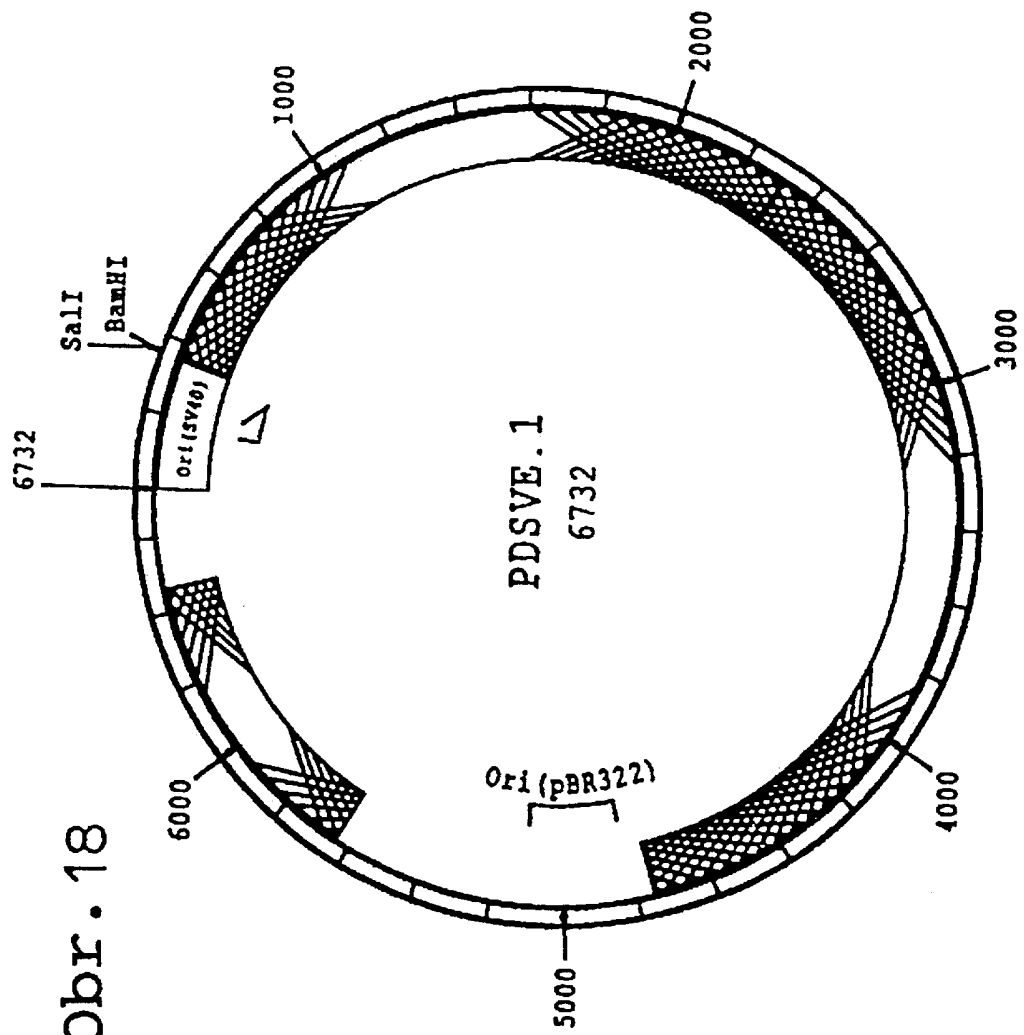
SN

SNRKA.N..G DS.L.WAAMA LPA.FSL.IG FAFGALYWKK .QP.L

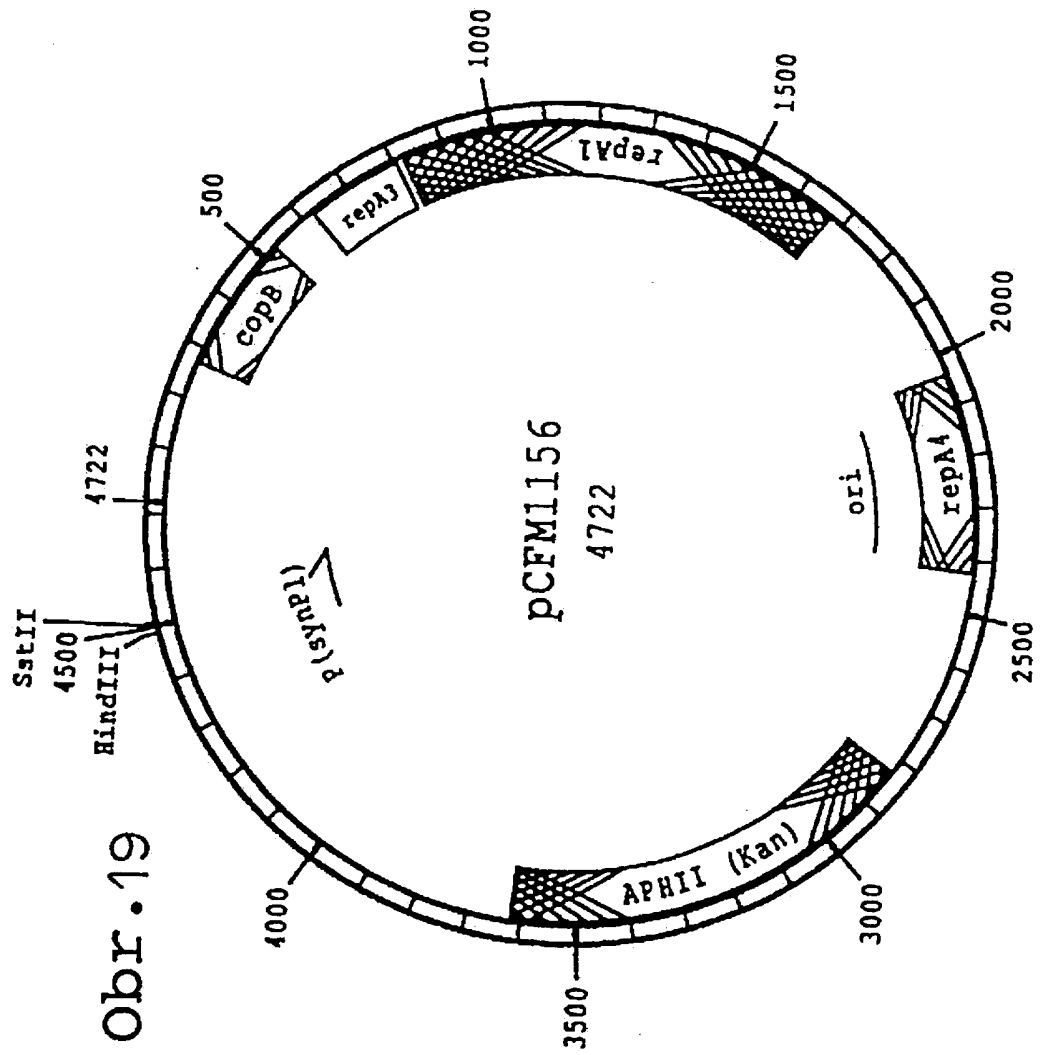
248

NIQINEEDNE ISMLQEKERE FQEV

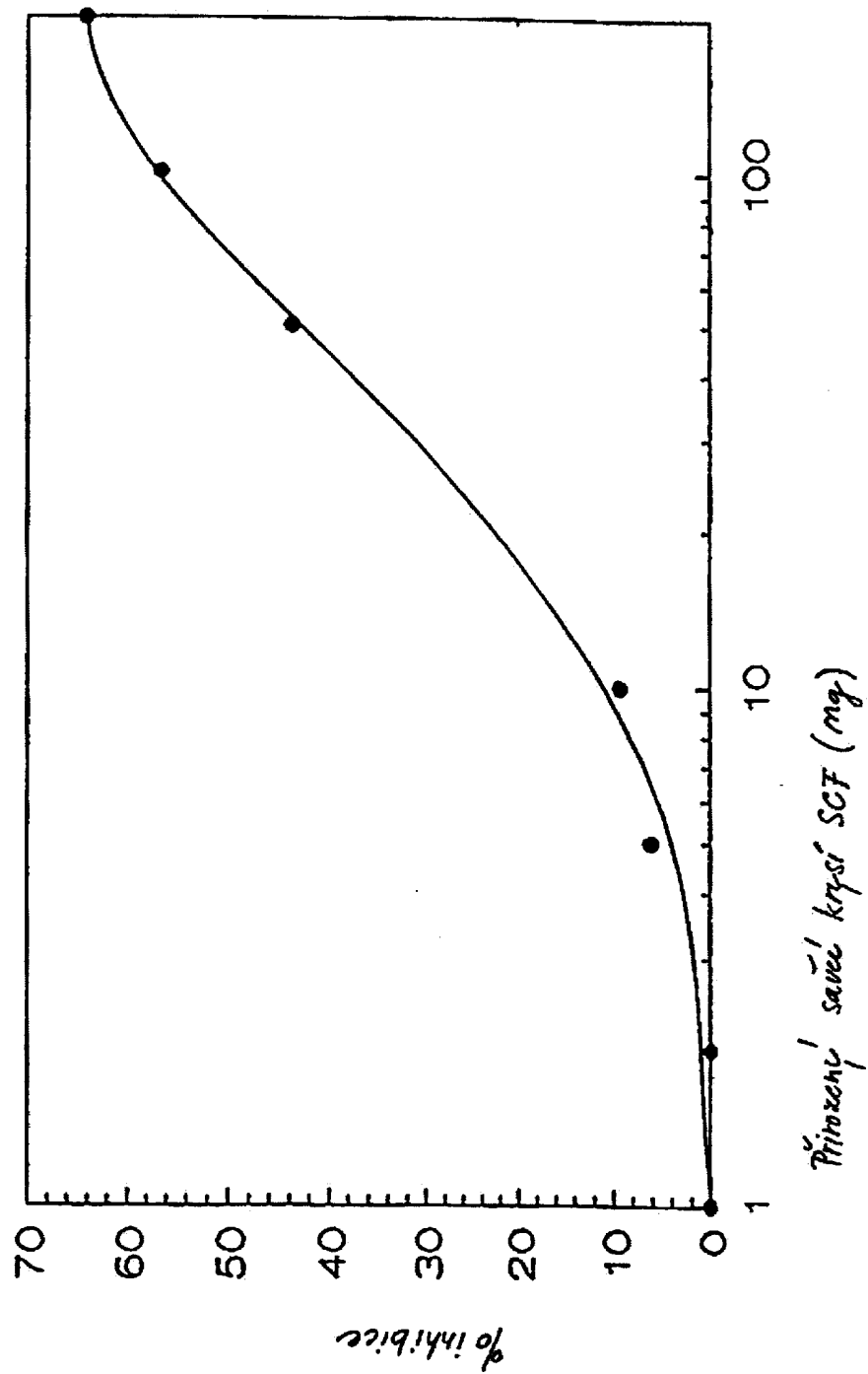




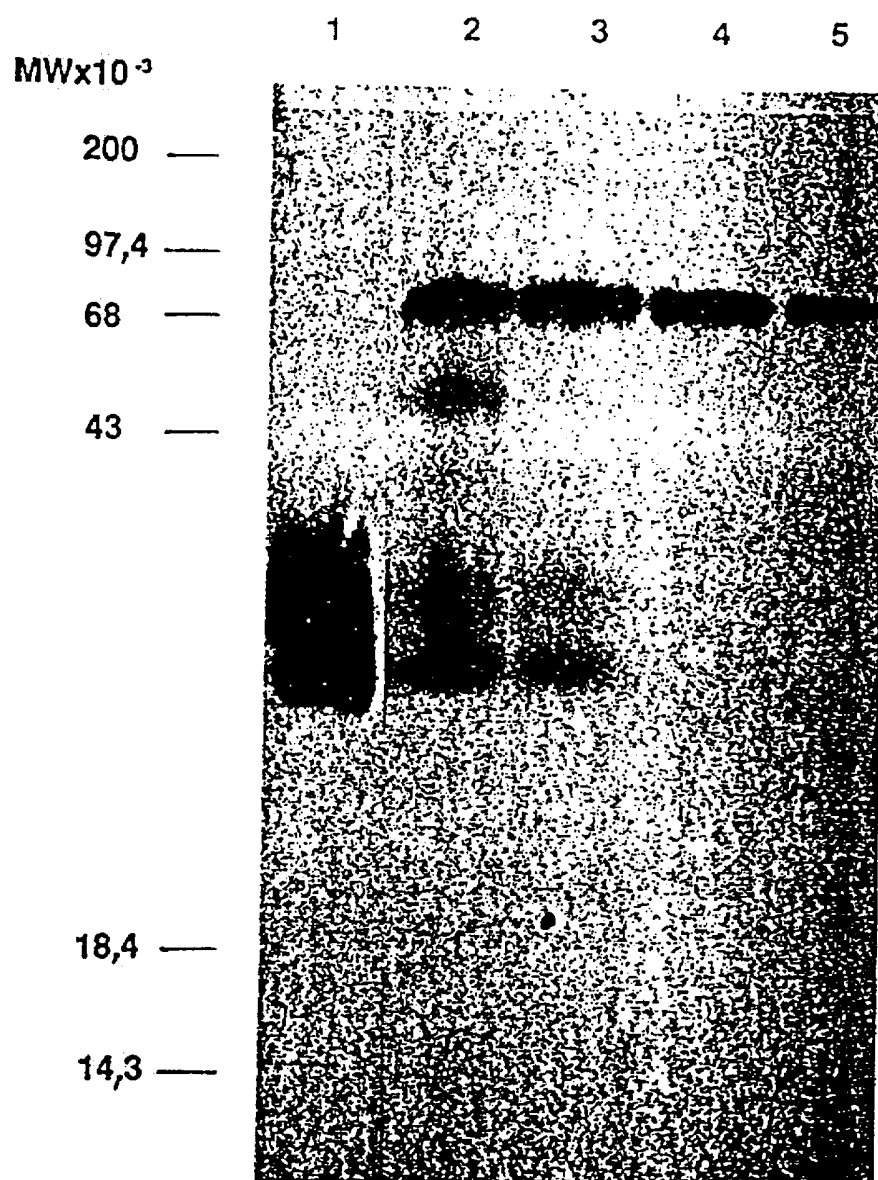
Obr. 18



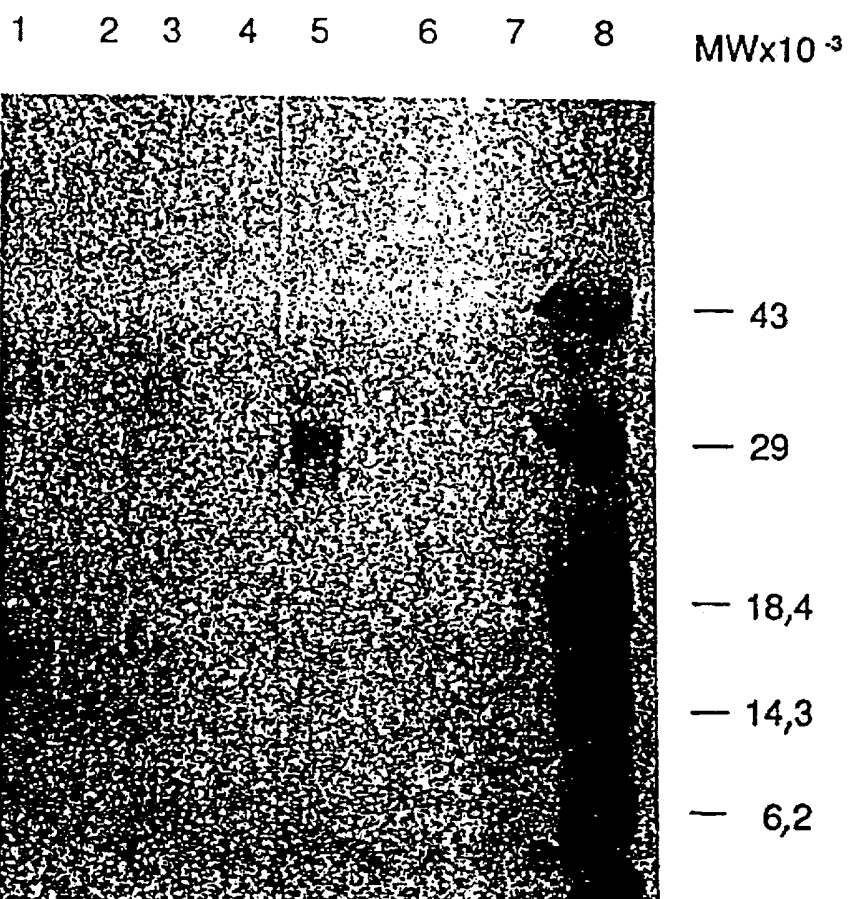
Obr. 20A



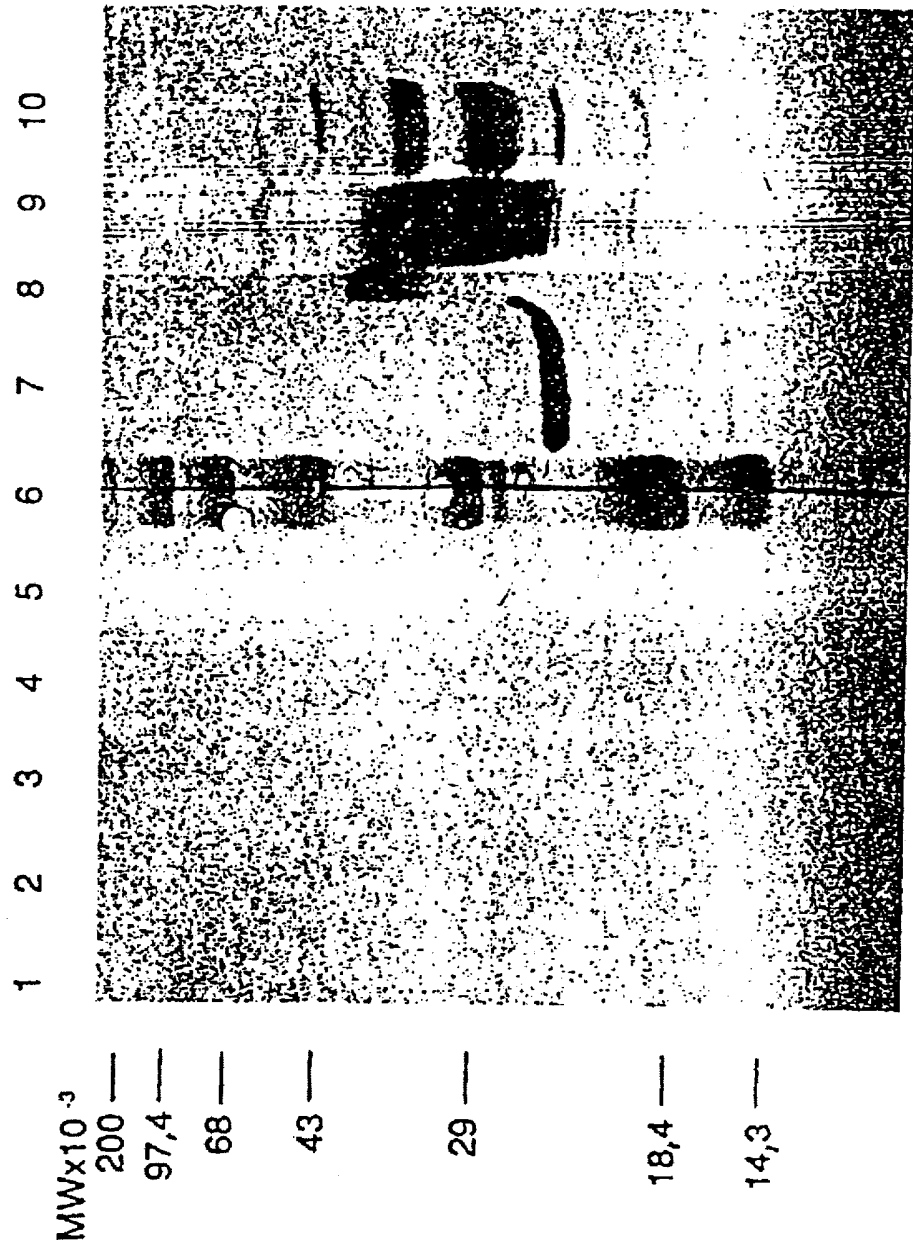
Obr. 20B



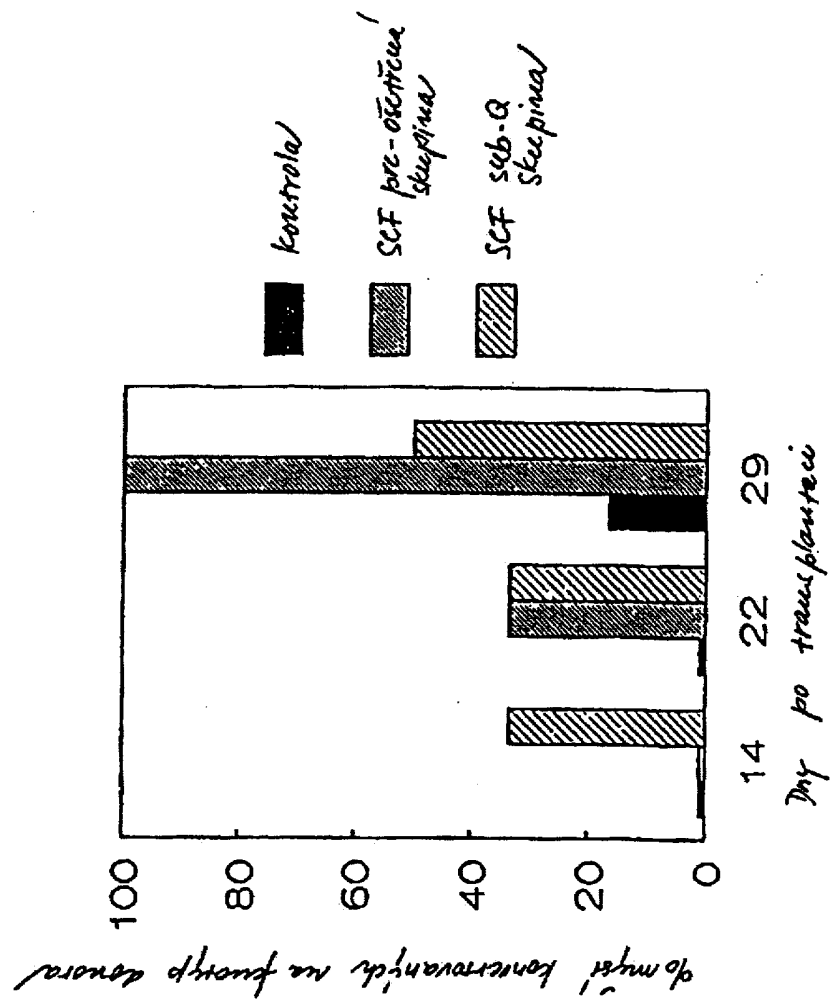
Obr. 21



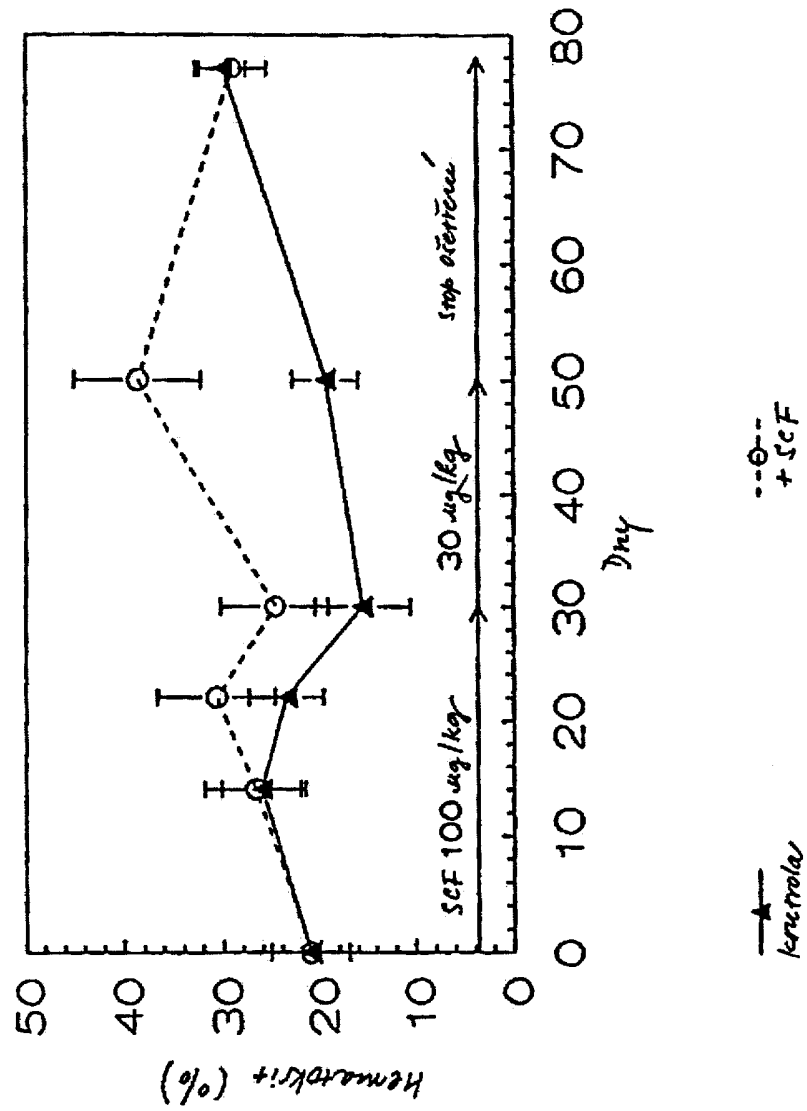
Obr. 22



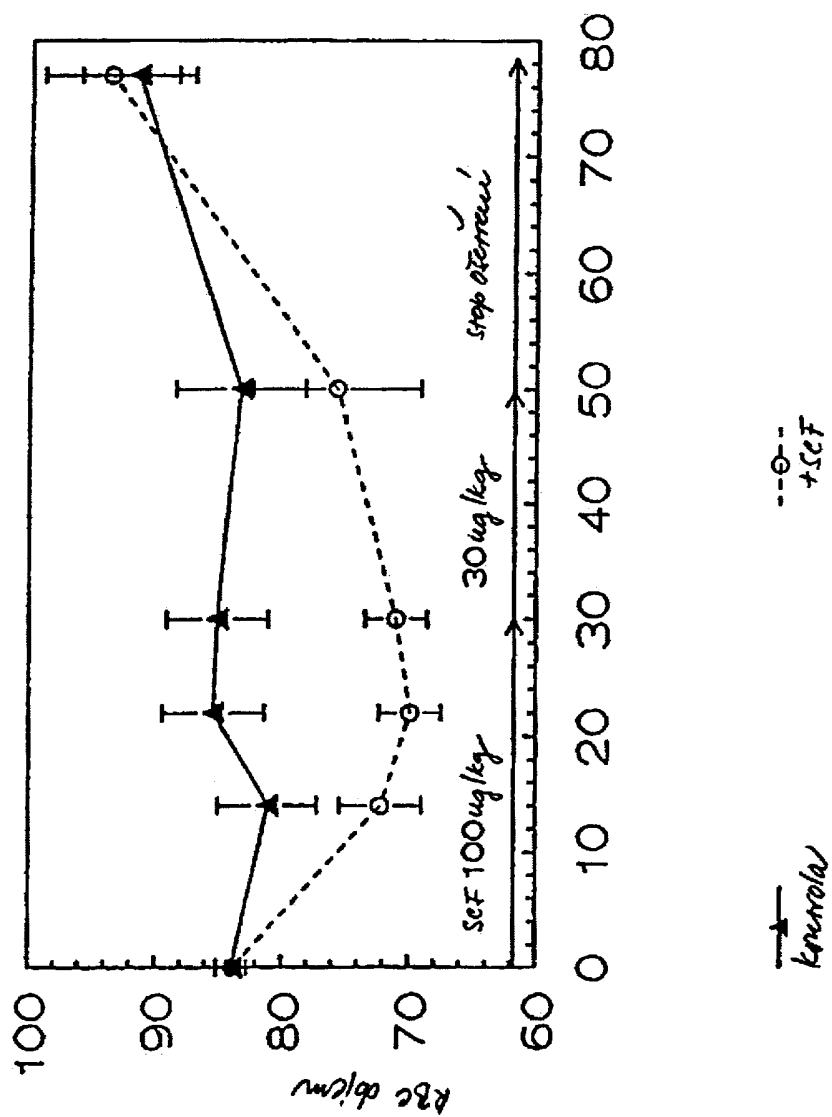
Obr. 23



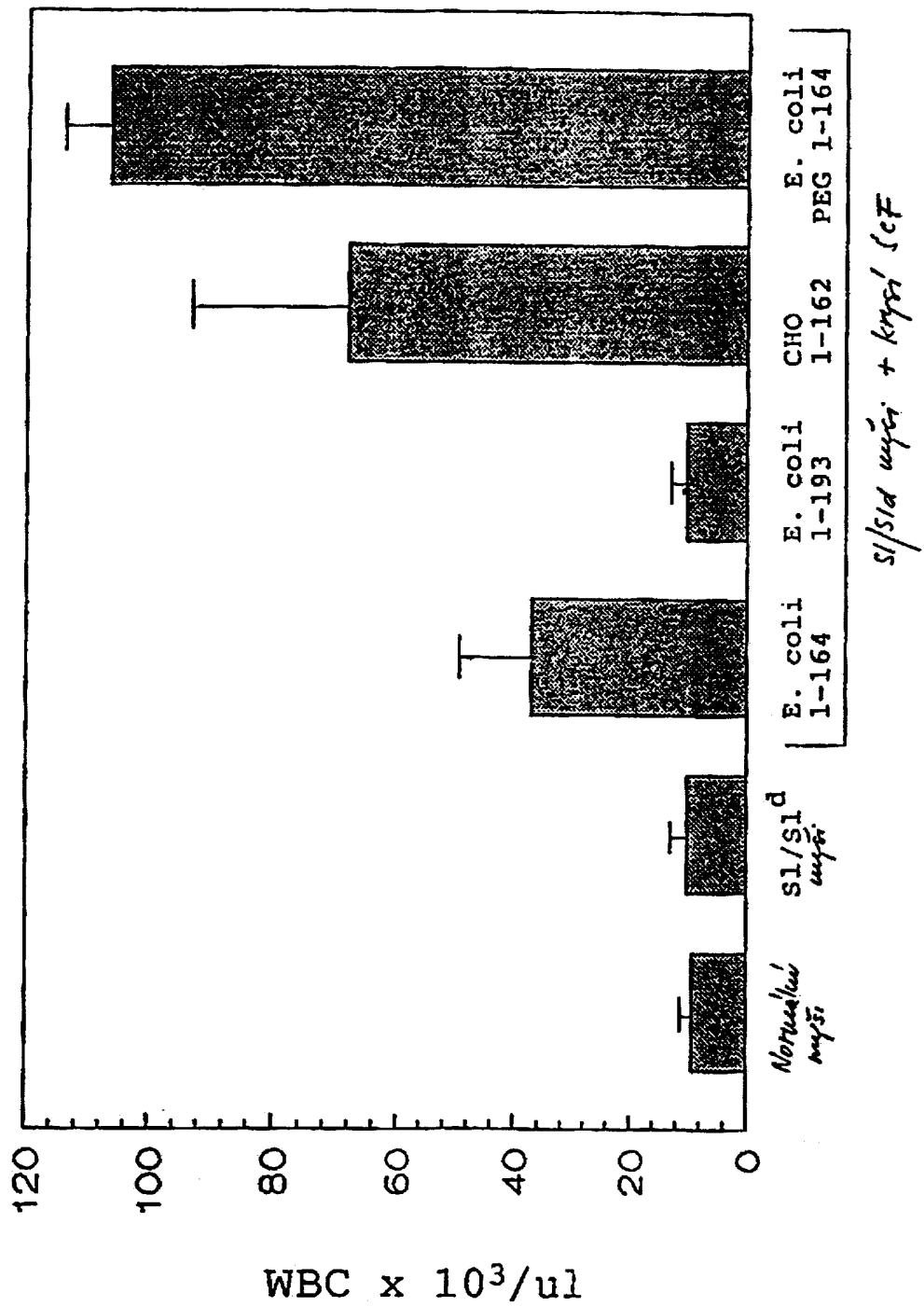
Obr. 24 A



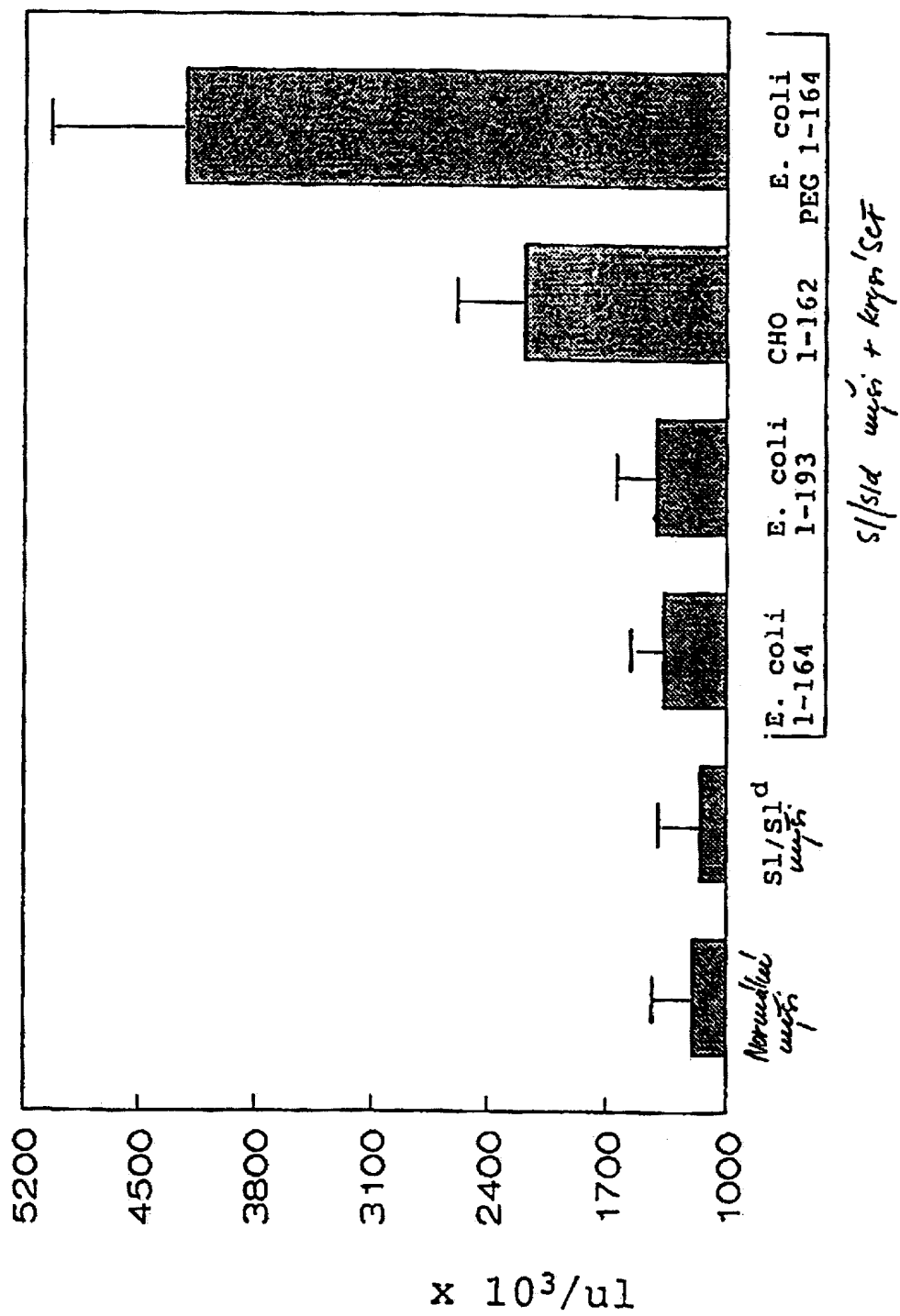
Obr. 24 B



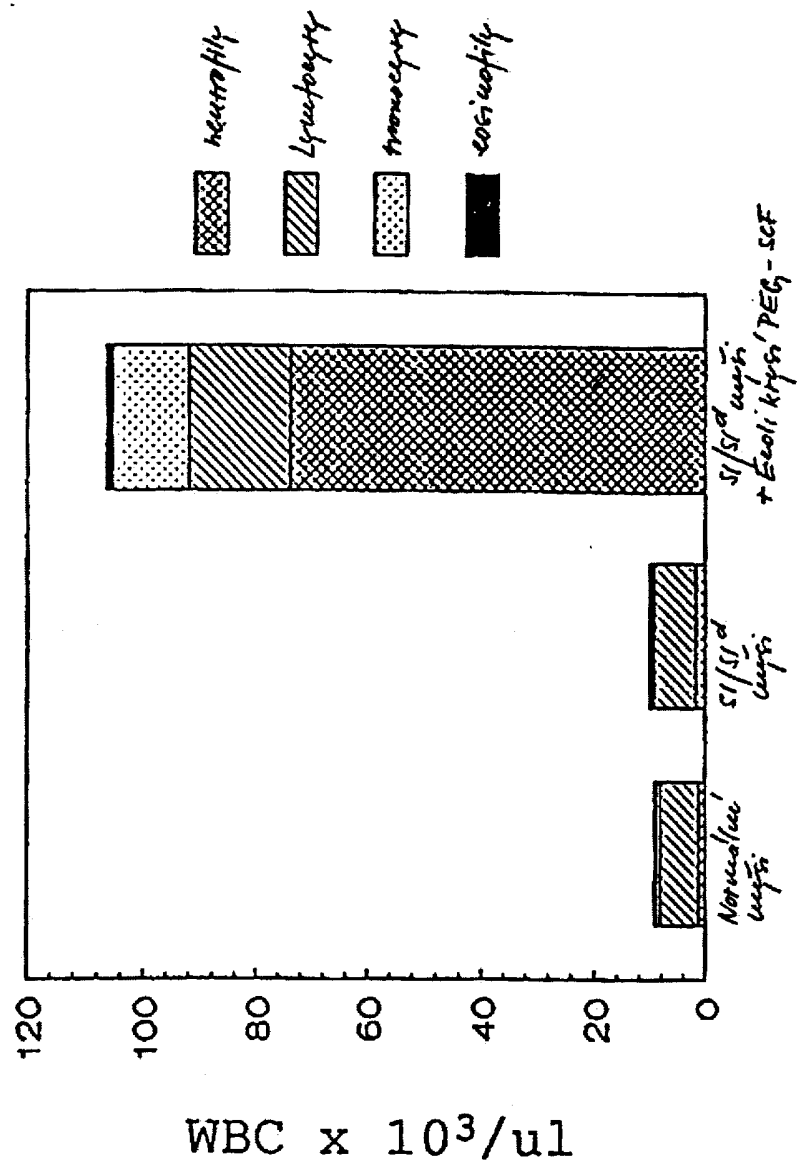
Obr. 25



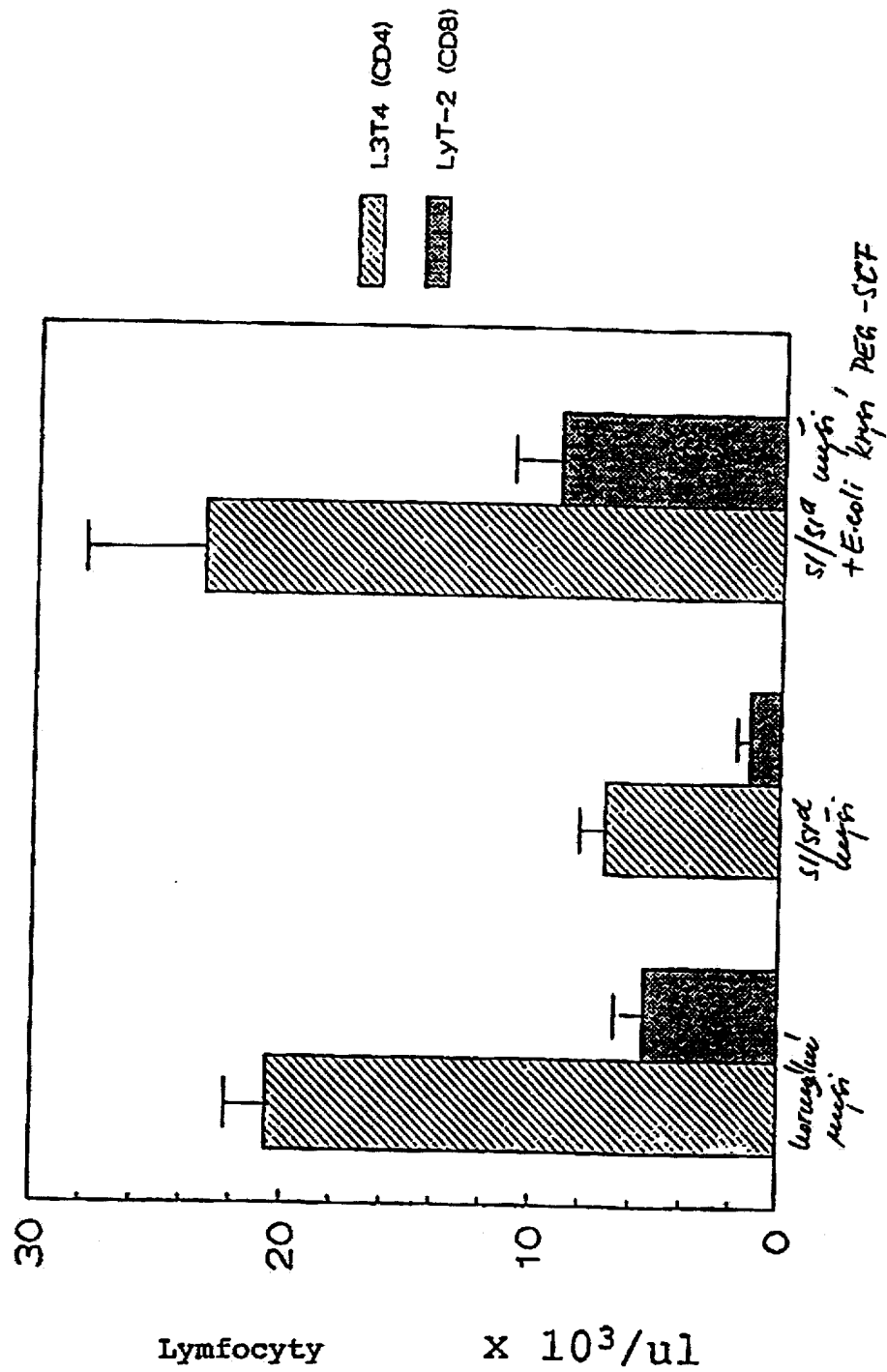
Obr. 26



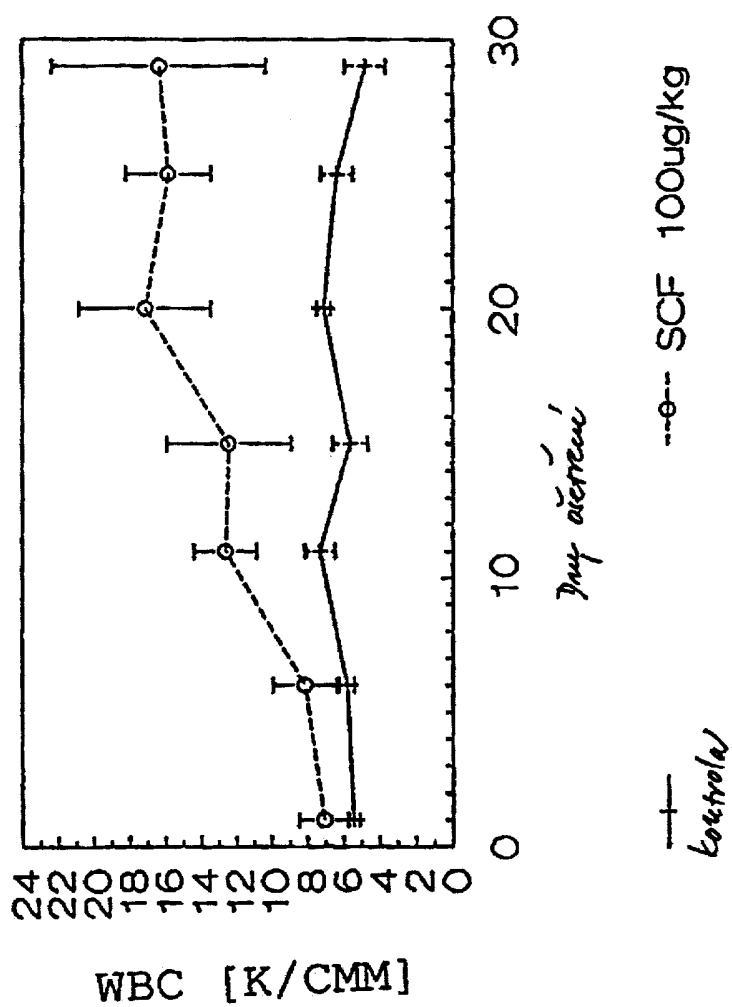
Obr. 27



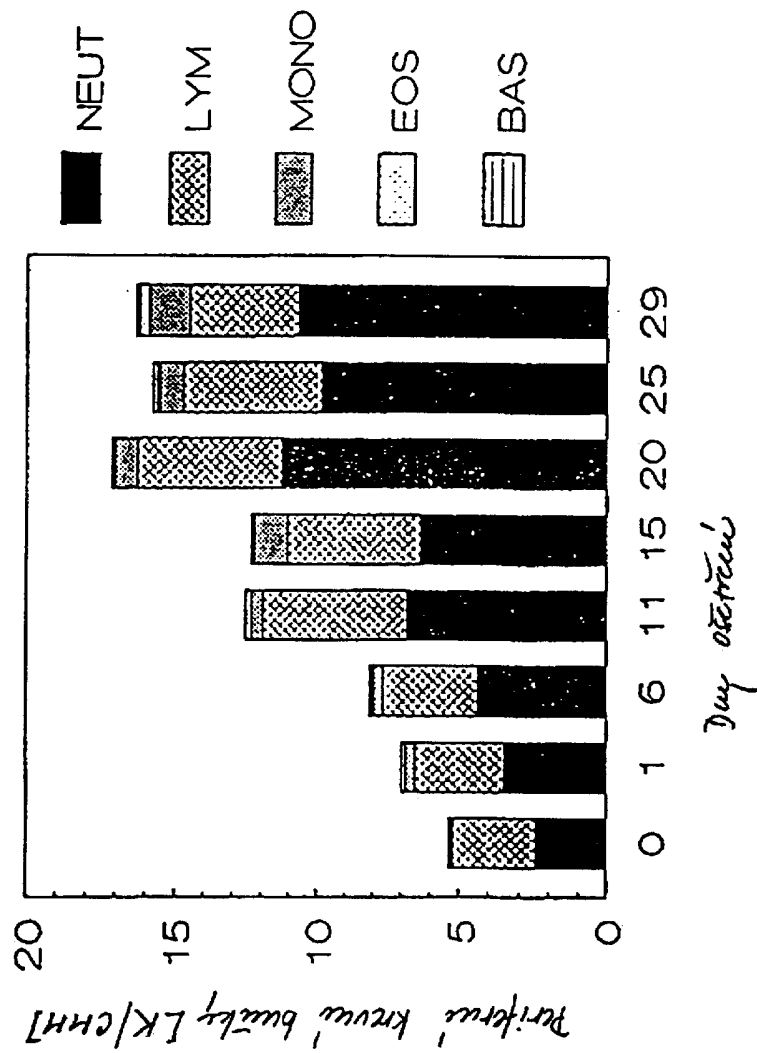
Obr. 28



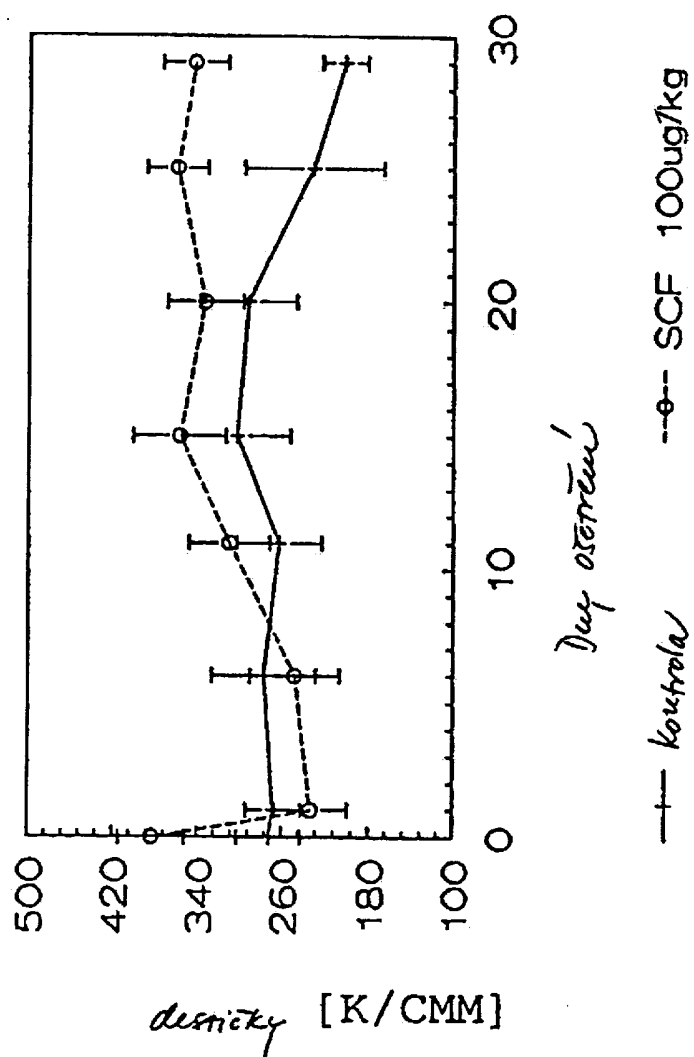
Obr. 29 A



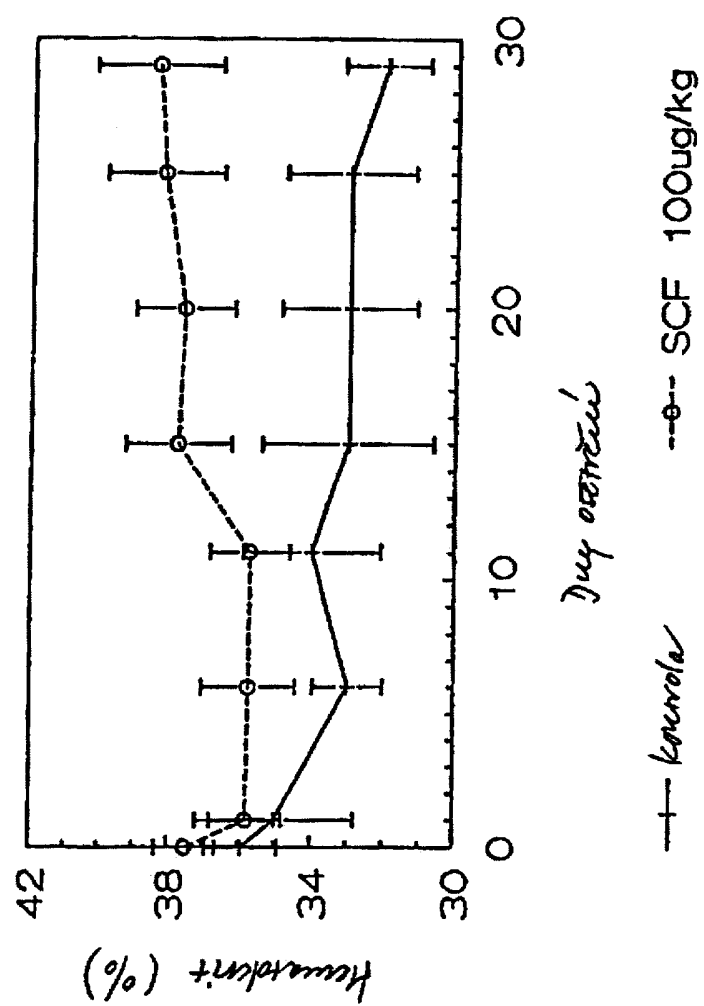
Obr. 29B



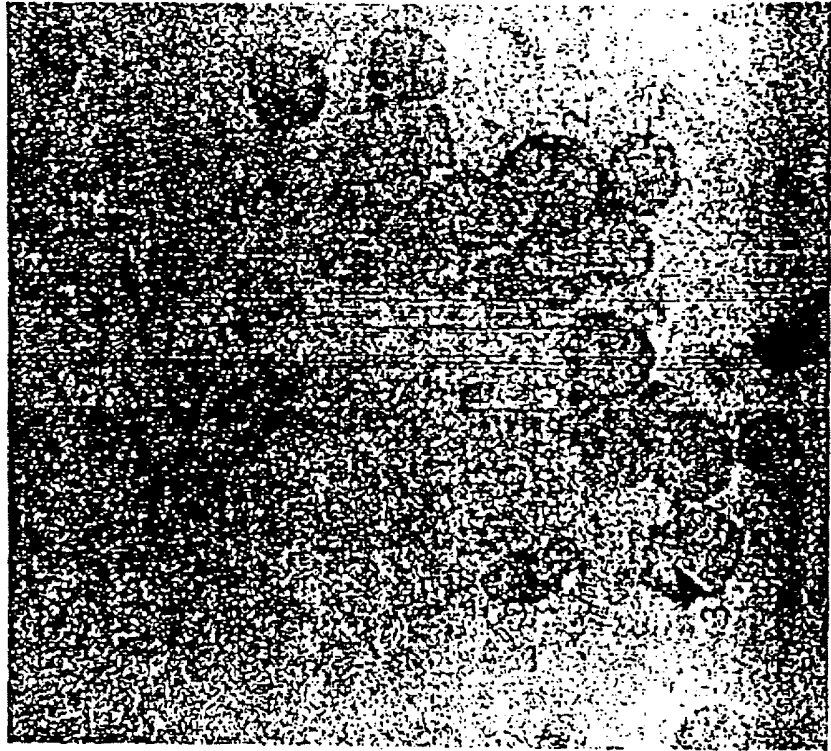
Obr. 30A



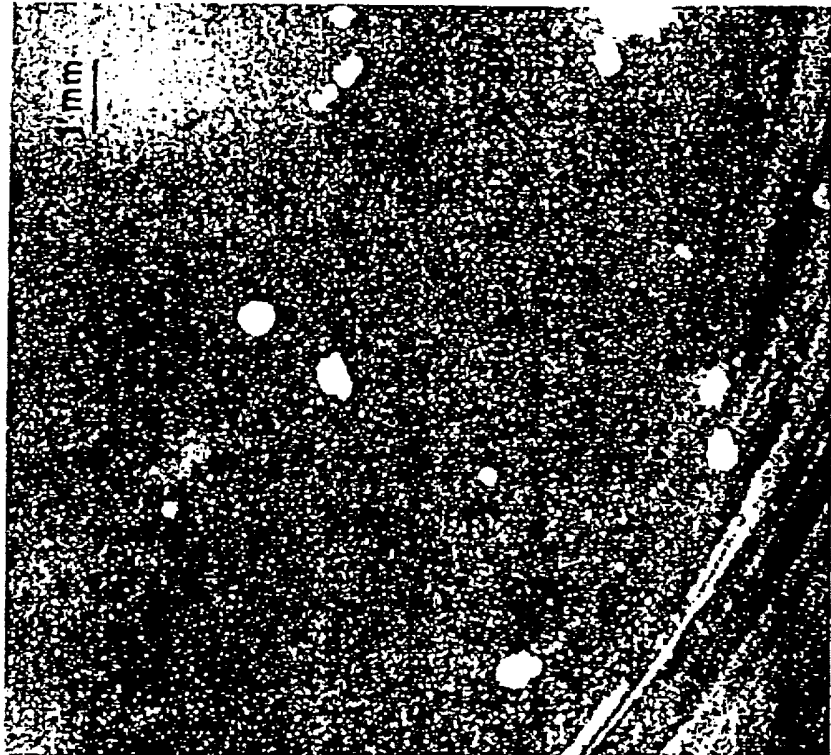
Obr. 30B



Obr. 31B



Obr. 31A



Obr. 32 A

Separate load

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



97,4 —

66,2 —

42,7 —

31,1 —

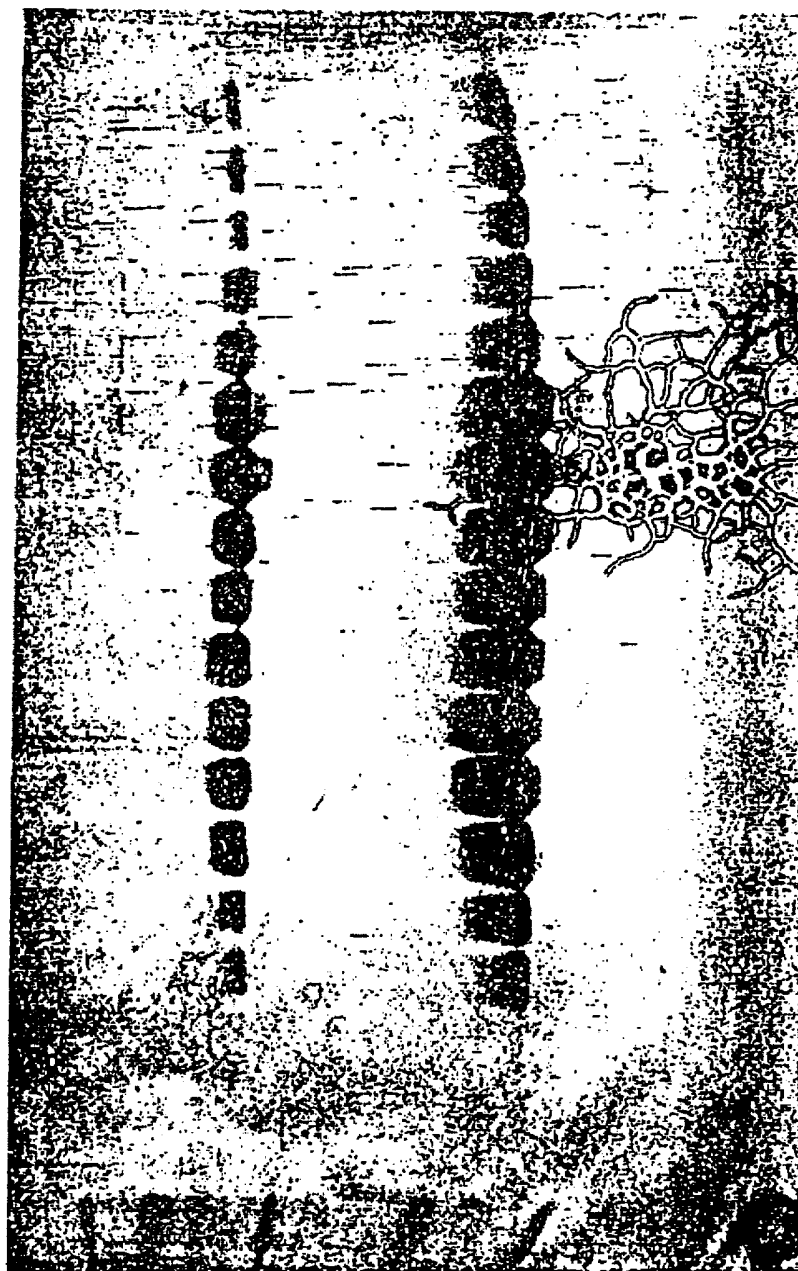
21,5 —

14,4 —

Obr. 32 B

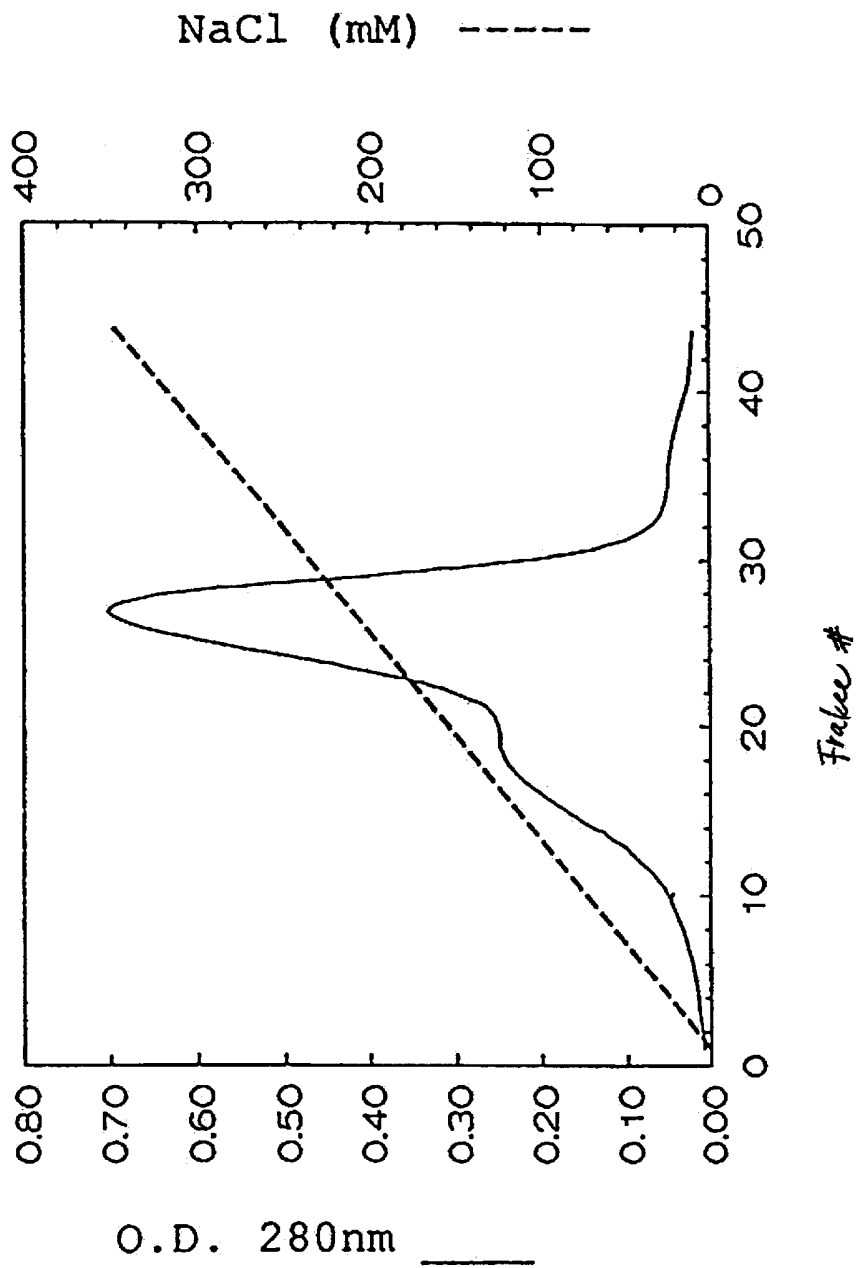
S. schwanke

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

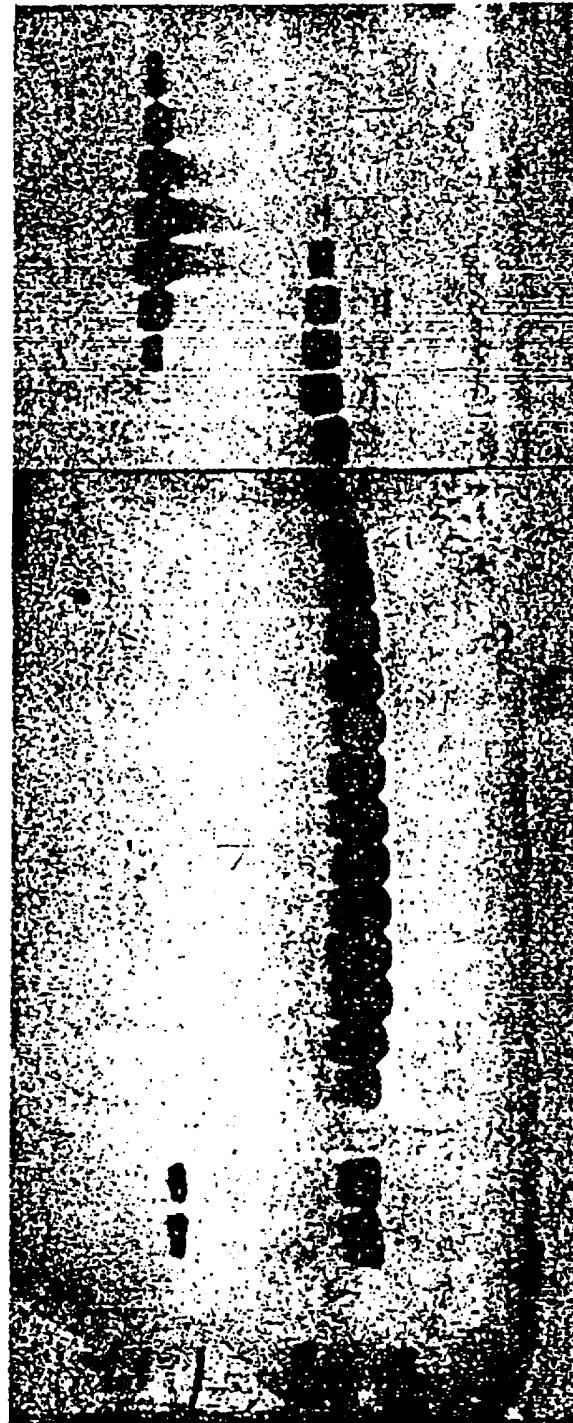
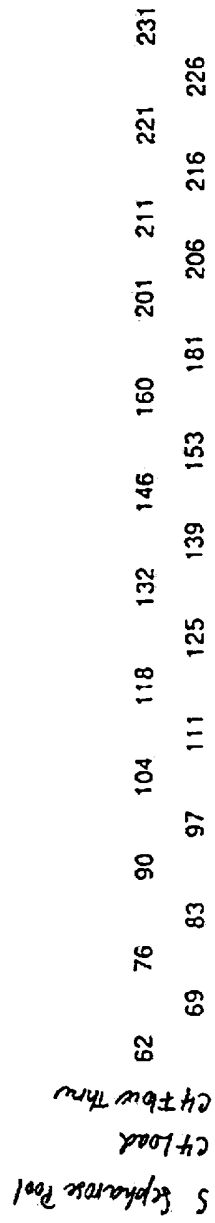


97,4 —
66,2 —
42,7 —
31,1 —
21,5 —
14,4 —

Obr. 33

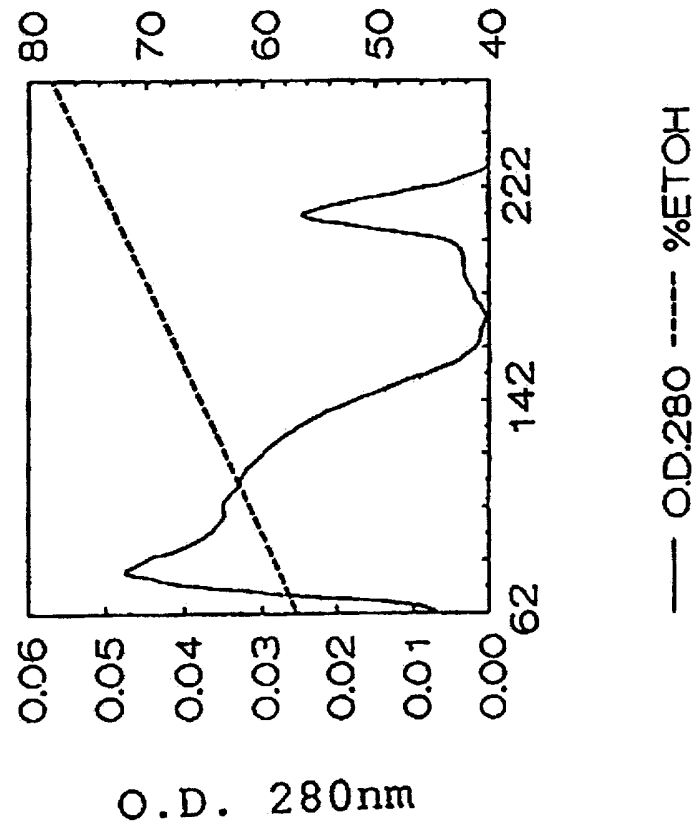


Obr. 34B

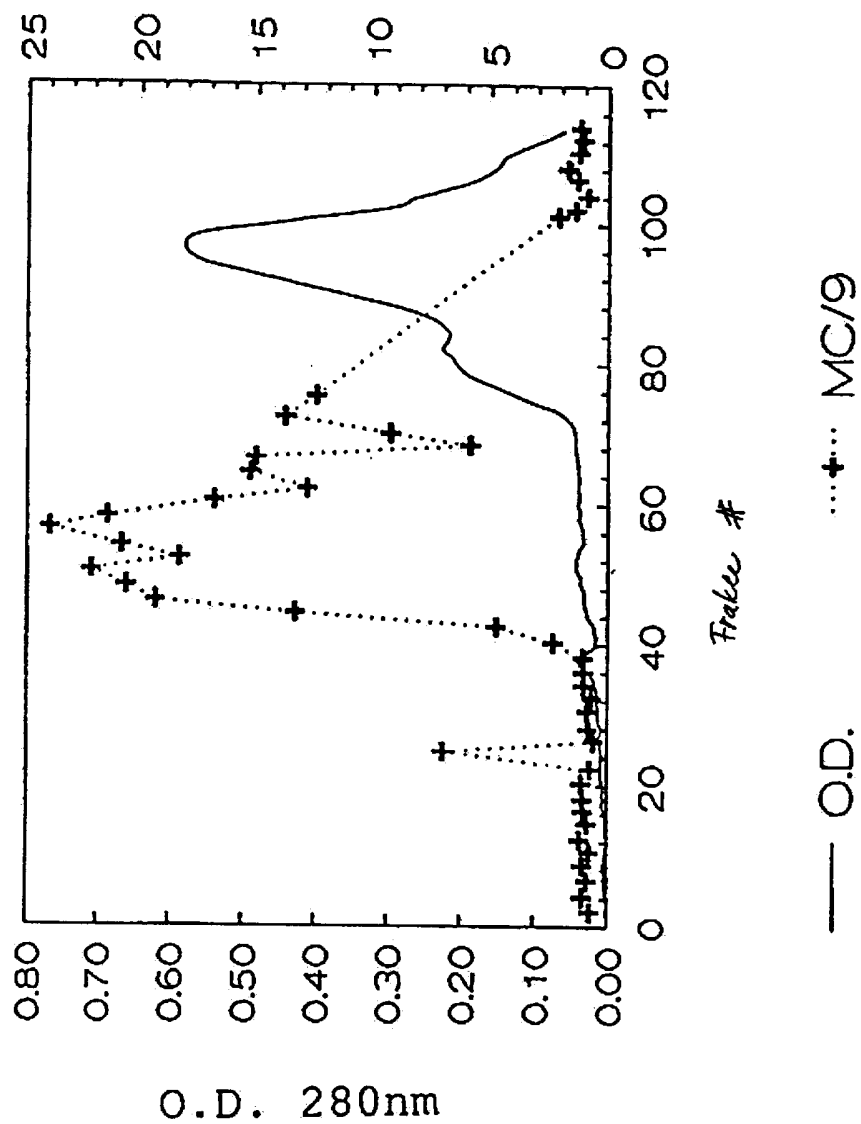


97,4 —
 66,2 —
 42,7 —
 31,1 —
 21,5 —
 14,4 —

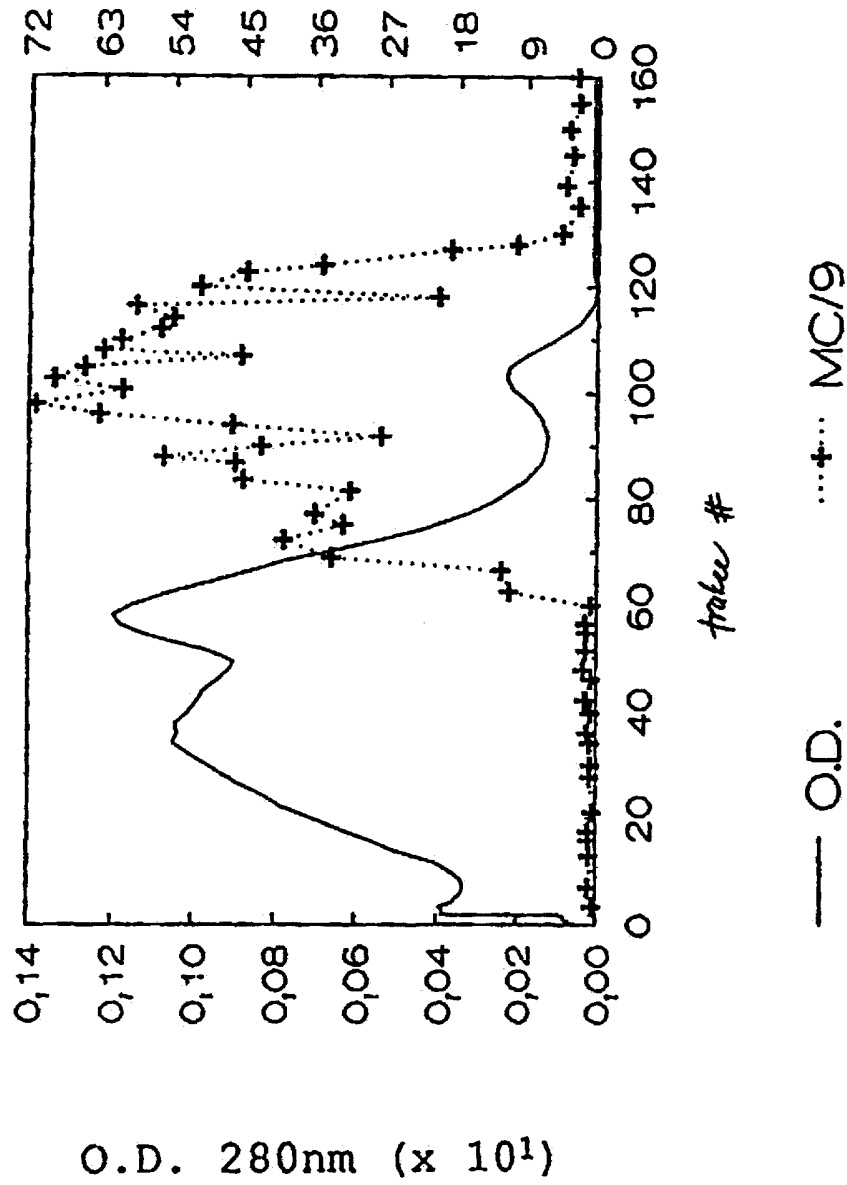
Obr. 35



Obr. 36

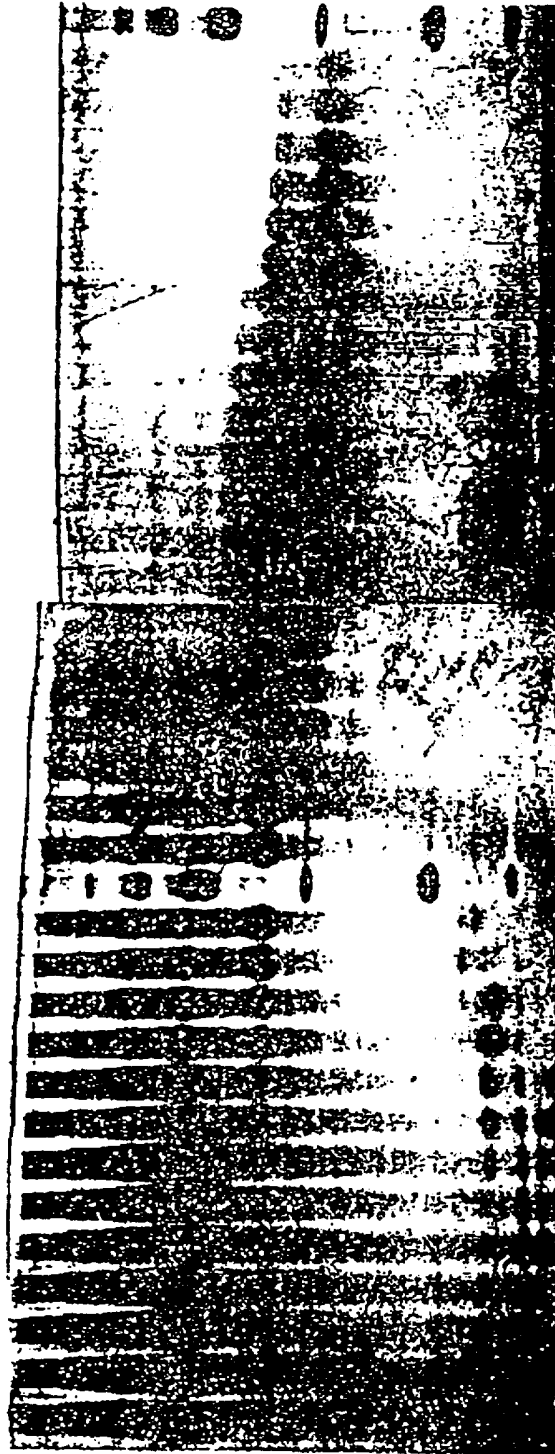
MC/9 CPM ($\times 10^{-3}$)

Obr. 37

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

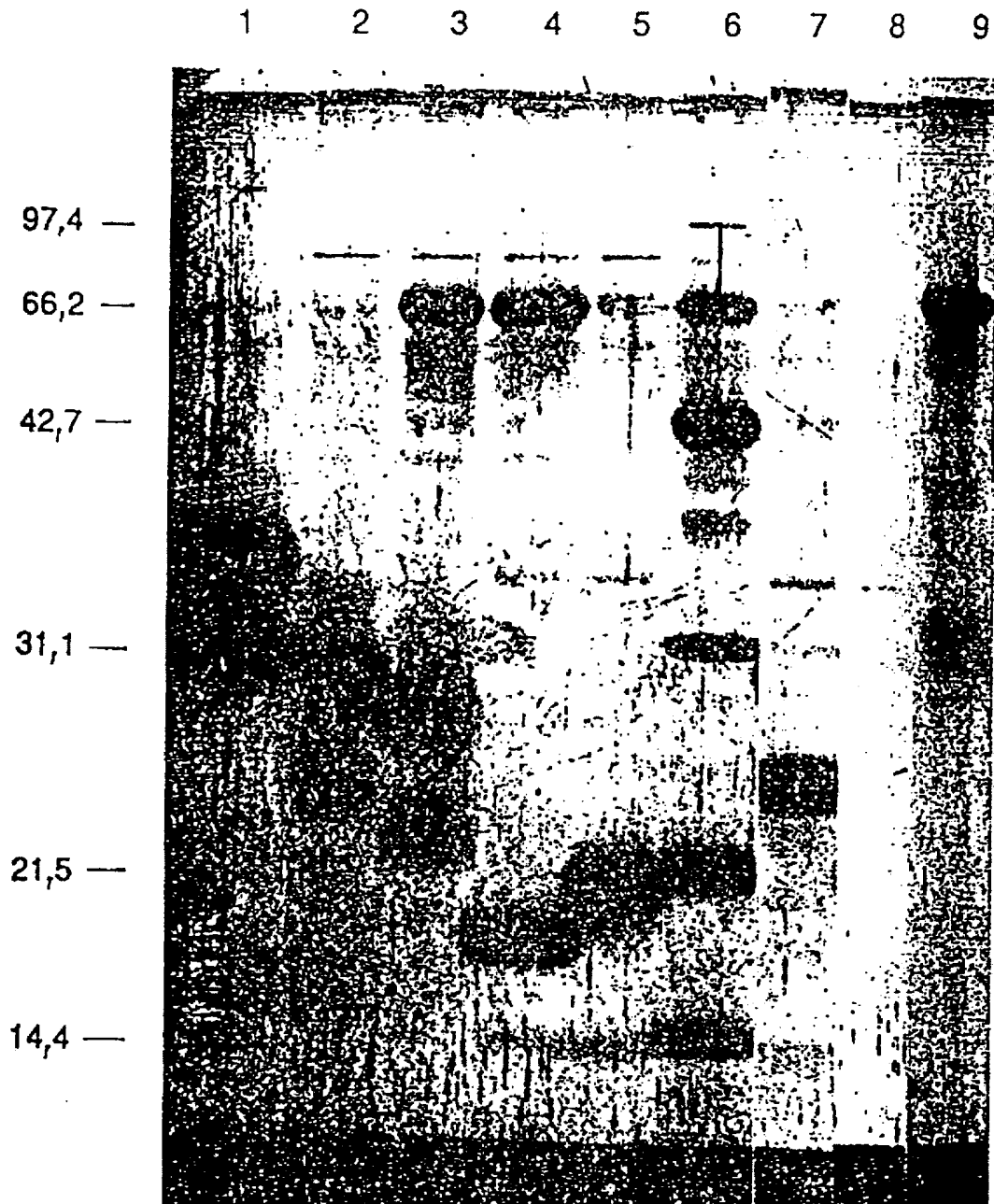
Obr. 38

48 51 54 57 60 63 66 69 72 75 78 81 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116 118 120 122 124

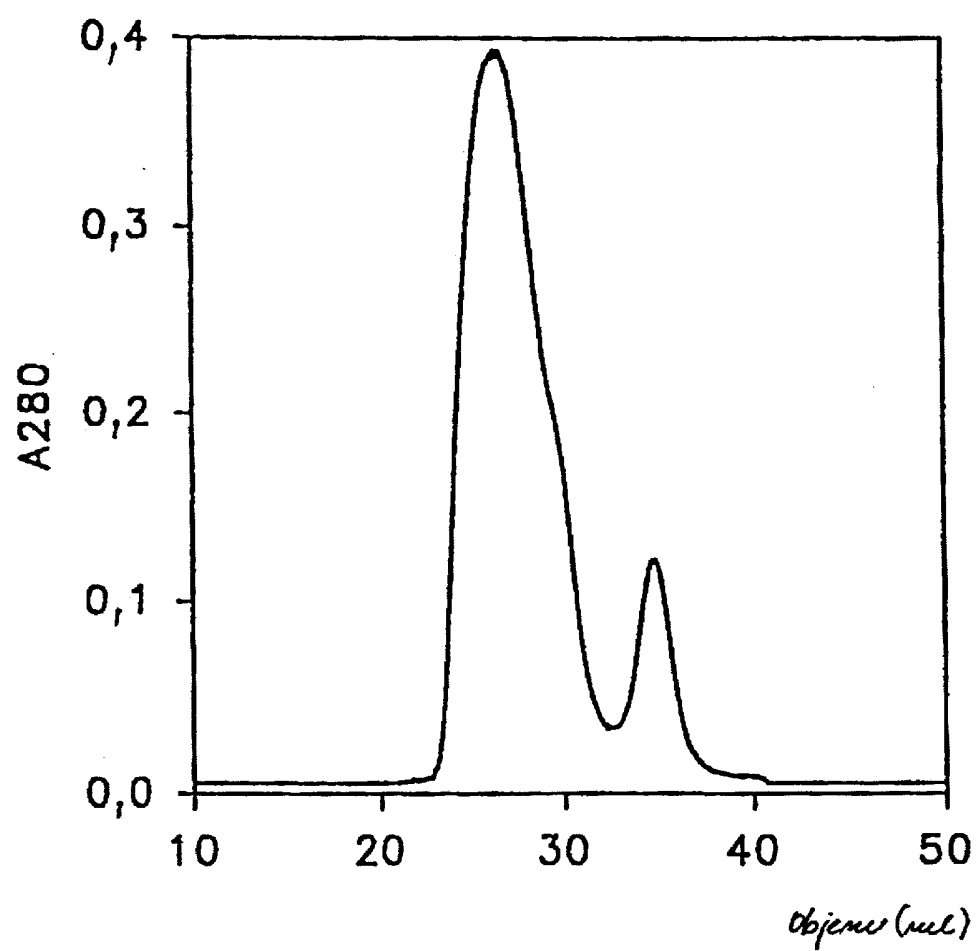


97,4 -
66,2 -
42,7 -
31,1 -
21,5 -
14,4 -

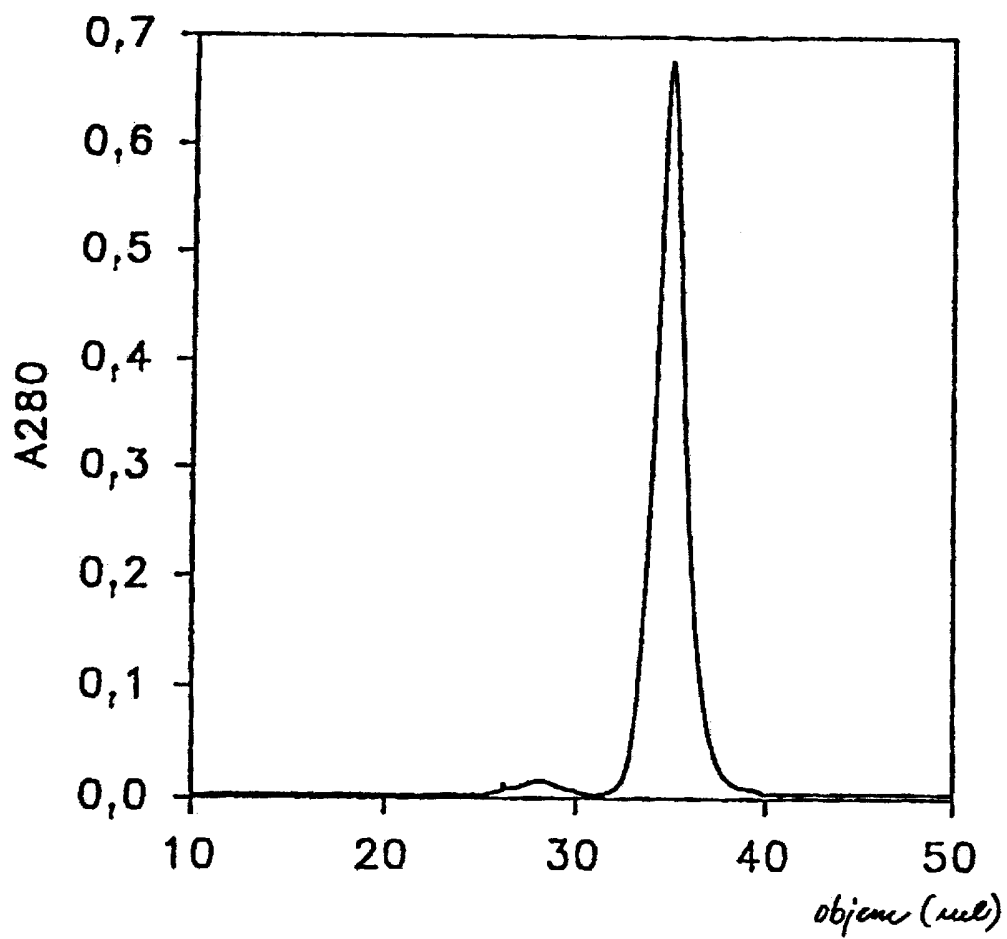
Obr. 39



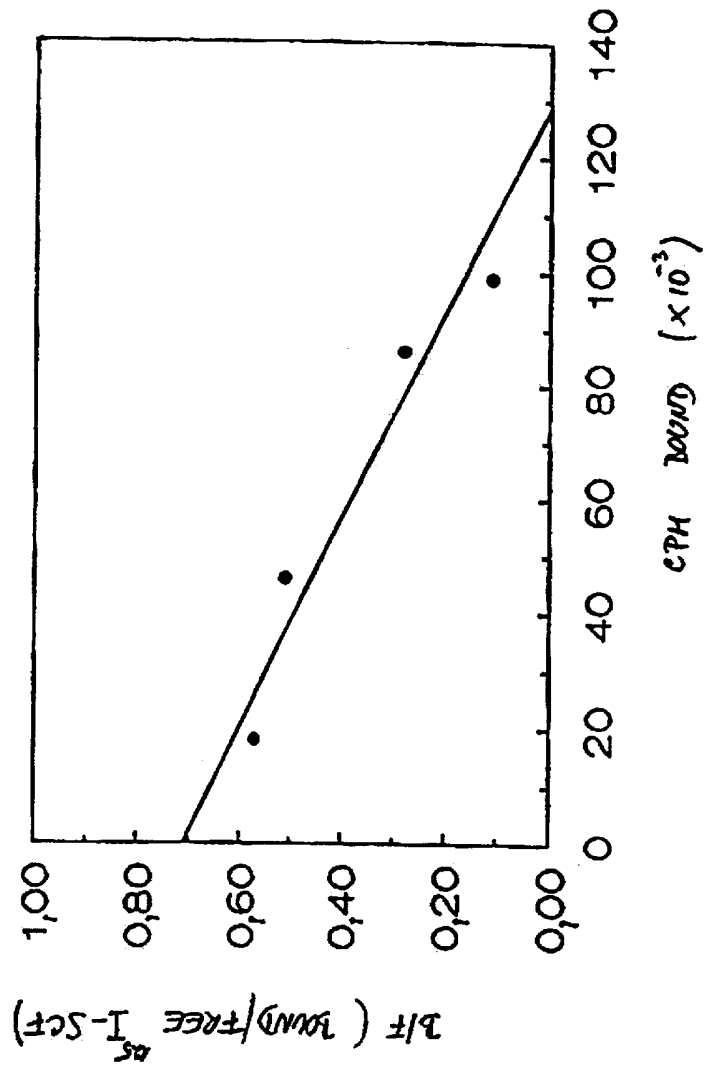
Obr. 40A



Obr. 40B



Obr. 41



Obr. 42A

CCGCCCTCGCGCGGAGACTAGAAAGCGCTGCGGGAAGCAGGACAGTGGAGAGGGCGCTGCGC 61

TCGGGCTACCCCAATGCGTGGACTATCTGCGCGCGCTGTTGCTGCAATATGCTGGAGCTCCA 122

GAACAGCTAAACGGAGTCGCCACACACCACTGTTTGTGCTGATCGCAGCGCTTTCCTT 183

-25 -20

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 GTC 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 GGG 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 Asn Lys Phe Ser Asn
CAA TTG TCA GAC AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCA AAT 453

Obr. 42B

Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val	80
ATT TCT GAA GGC TTG AGT AAT TAT TCC ATC ATA GAC AAA CTT GTG	498
70	
Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser	90
AAT ATA GTG GAT GAC CTT GTG GAG TGC GTG AAA GAA AAC TCA TCT	543
100	
Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe	110
AAG GAT CTA AAA AAA TCA TTC AAG AGC CCA GAA CCC AGG CTC TTT	588
120	
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
130	
Phe Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val	140
TTC AAG GAC TTT GTA GTG GCA TCT GAA ACT AGT GAT TGT GTG GTT	678
150	
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

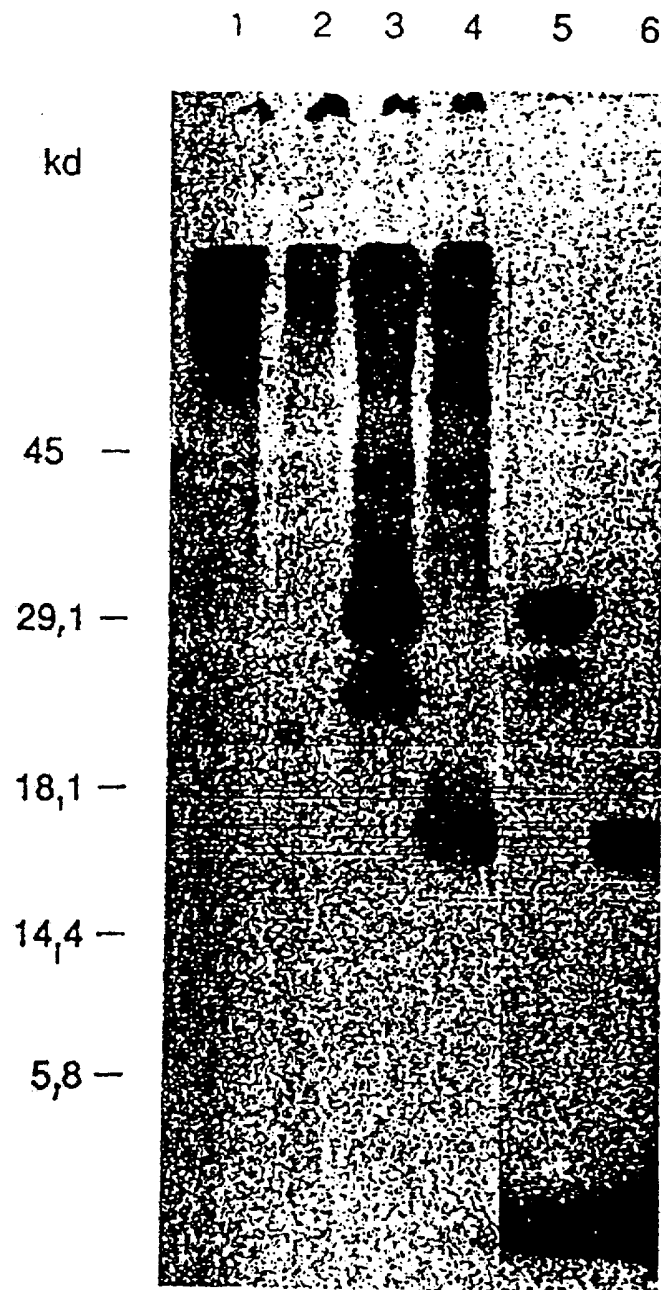
Obr. 42C

Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn AAA CCA TTT ATG TTA CCC CCT GTT GCA GCC AGC TCC CTT AGG AAT	160	170	768
Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp GAC AGC AGT AGC AGT AAT AGG AAG GCC AAA AAT CCC CCT GGA GAC	180	813	
Ser Ser Leu His Trp Ala Ala Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser TCC AGC CTA CAC TGG GCA GCC ATG GCA TTG CCA GCA TTG TTT TCT	190	200	858
Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Leu Leu Tyr Trp Lys Lys Arg CTT ATA ATT GGC TTT GCT TTT GGA GCC TTA TAC TAC TGG AAG AAG AGA	210	903	
Gln Pro Ser Leu Thr ACA Arg Ala Val Glu Asn Ile Gln Ile Asn Glu CAG CCA AGT CTT CTA ACA AGG GCA GTT GAA AAT ATA CAA ATT AAT GAA	220	230	948
Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg Glu Phe GAG GAT AAT GAG ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA GAG TTT	240	993	
Gln Glu Val CAA GAA GTG TAA	248		
		TTGTGGCTTGATCAACACTGTACTTTTCGTACATTGSC 1044	

Obr. 42D

TGGTAACAGTTCATGTTGGCTTCATAAATGAAGCAGCCTTTAAACAATTCATATTCTGTC 1104
TGGAGTGACAGACCACATCTTTATCTGTCTTGTCTGCTACCCCATGACTTTATATGGATGATTC 1164
AGAAATTGGAACACAGAAATGTTTTTACTGTGTGAAACTGGCAGCTGAATTAATCATCTATAAAGAA 1224
GAACTTGTCATGGAGCAGGACTCTATTTTAAAGGACTGCGGGACTTGGGTCTCATTTAGAAC 1284
TTGCAGCTGATGTTGGAAGAGAAAGCACGCTGCTCAGACTGCATGTACCATTTGCATGGC 1344
TCCAGAAATGCTCTAAATGCTGAAAAAACACCTAGCTTTATTCTTCAGATACAAAACCTGCAG 1404

Obr. 43



Obr. 44A

	AGCAGGGACAGTGGAGAGGGCGCTGCGCTC	30
GGGCTACCCAATGCGTGGACTATCTGCCCGCGCTGTTCGTGCAATATGCTGGAGCTCCAG		90
AACAGCTAAACGGAGTCGCCACACCACTGTTTGCTGGATCGCAGCGCTTTCCTT		150
-25	-20	
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	1	
Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg		
CTG CTC CTA TTT AAT CCT CCT CTC GTC AAA ACT GAA GGG ATC TGC AGG		240
10	20	
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

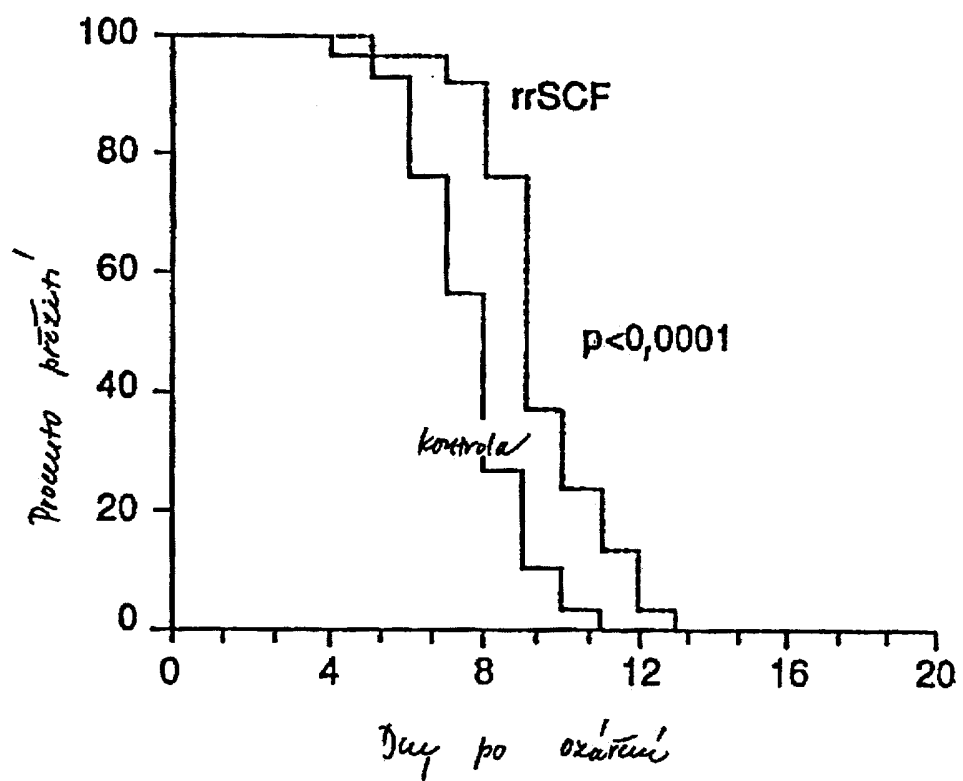
Obr. 44B

Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn	60	420
CAA TTG TCA GAC AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCA AAT		
Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val	70	80
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	90	510
AAT ATA GTG GAT GAC CTT GTG GAG TGC GTG AAA GAA AAC TCA TCT		
Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe	100	110
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	120	600
ACT CCT GAA GAA TTC TTT AGA ATT TTT AAT AGA TCC ATT GAT GCC		
Phe Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val	130	140
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	150	690
TCT TCA ACA TTA AGT CCT GAG AAA GGG AAG GCC AAA AAT CCC CCT		

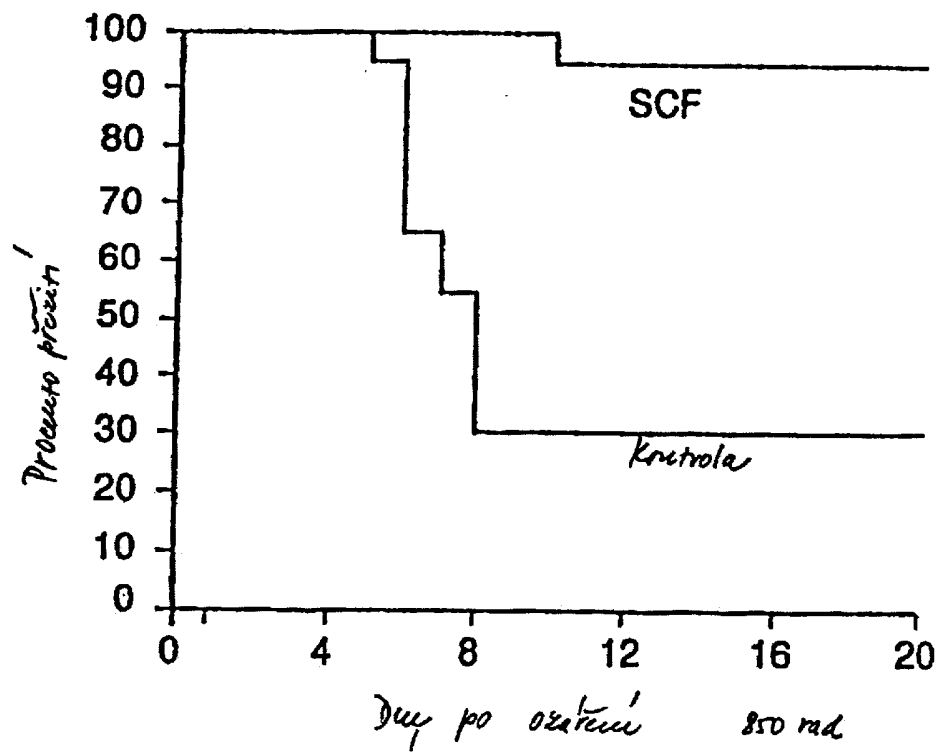
Obr. 44C

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
	180	
	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
	190	
	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
	210	
	Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Glu Lys Glu Arg	
	AAT GAA GAG GAT AAT GAG ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA	870
	220	
	Glu Phe Gln Glu Val	
	GAG TTT CAA GAA GTG TAA TTGTGGCTTGATCAACACTGTTACTTTCGTA	920
	CATTGGCTGGTAACAGTTCATGTTTGCTTCATAAATGAAGCAGCTTTAAACAATTCTATA	980
	TTCTGTCTGGAGTGACAGACCACATCTTTATCTGTTCTTGCTACCCATGACTTTATATGG	1040
	ATGATTTCAGAAATTGGAACAGAAATGTTTTTACTGTGAAACTGGCACTGA	1088

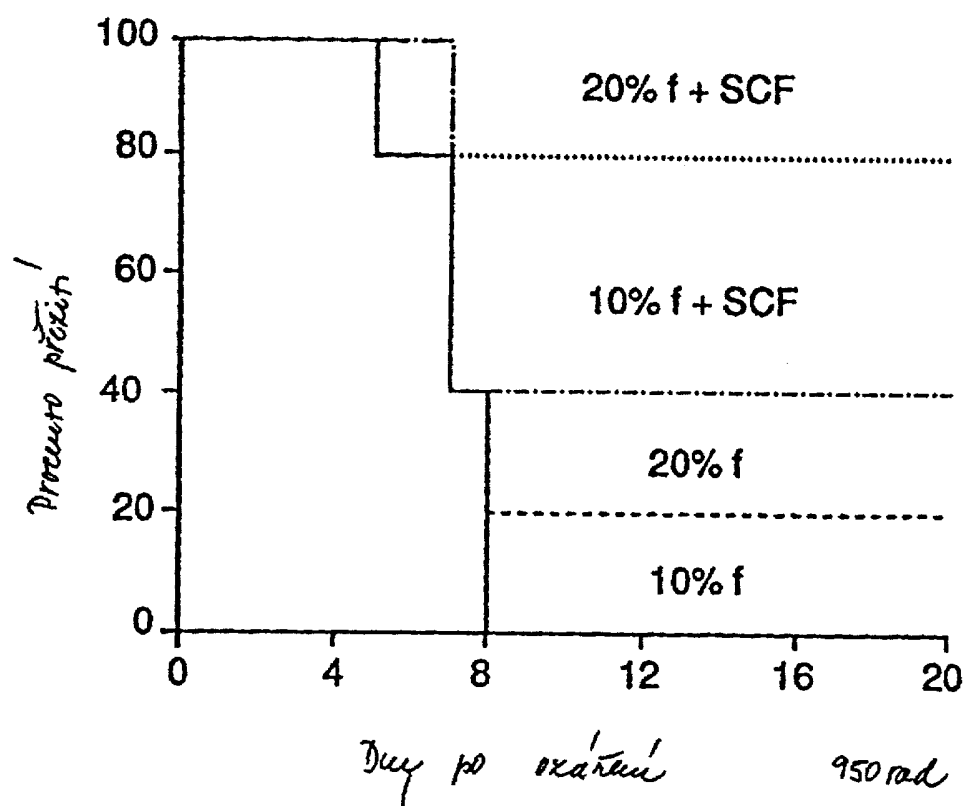
Obr. 45



Obr. 46



Obr. 47



Konec dokumentu
