

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

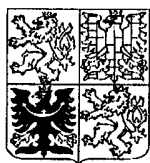
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2606-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08. 03. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.03.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/207412**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 05. 97**
(Věstník č. 5/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/02950**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/24414**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 07 H21/00

C 07 K14/50

A 61 K38/18

(71) Přihlášovatel:

HUMAN GENOME SCIENCES, INC.,
Rockville, MD, US;

(72) Původce:

Hu Jing-Shan, Gaithersburg, MD, US;
Gocayne Jeannine D., Silver Spring, MD, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Fibroplastový růstový faktor-10

(57) Anotace:

Lidské polypeptidy FGF-10 a DNA (RNA) kodující tyto polypeptidy FGF-10. Postup výroby těchto peptidů rekombinančními metodami. Způsoby použití tohoto polypeptidu ke stimulaci revaskularizace, k ošetřování ran a k prevenci neuronálního poškození. Antagonické proti těmto polypeptidům a jejich použití jako terapeutických prostředků k prevenci abnormální proliferace buněk, hypervaskulárních onemocnění a proliferace epitelálních buněk čůčky. Diagnostické způsoby pro detekci mutací v kodující sekvenci FGF-10 a změn koncentrace proteinu FGF-10 ve vzorku získaném od hostitele.

CZ 2606-96 A3

Fibroblastový růstový faktor-10

Oblast techniky

Č. j.	164597
DOŠLO	05 IX 96
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

Vynález se týká nově identifikovaných polynukleotidů, polypeptidů kódovaných těmito polynukleotidy, použití těchto polynukleotidů a polypeptidů a výroby těchto polynukleotidů a polypeptidů. Polypeptidy podle vynálezu jsou konkrétně fibroblastový růstový faktor-10/heparin vázající růstový faktor-10, dále označované jako „FGF-10“. Vynález se rovněž týká inhibice působení těchto polypeptidů.

Dosavadní stav techniky

Fibroblastové růstové faktory jsou skupina proteinů, charakteristických vazbou na heparin, a proto se také nazývají heparin vázající růstové faktory (HBGF). Expres různých těchto proteinů byla zjištěna v různých tkáních a dochází k ní pod zvláštní časovou a prostorovou kontrolou. Tyto proteiny jsou účinnými mitogeny pro různé buňky mesodermálního, ektodermálního a endodermálního původu, zahrnující fibroblasty, korneální a vaskulární endotheliální buňky, granulocyty, adrenální kortikální buňky, chondrocyty, myoblasty, buňky vaskulárního hladkého svalstva, epiteliální buňky čočky, melanocyty, keratinocyty, oligodendrocyty, astrocyty, osteoblasty a hematopoietické buňky.

Každý z těchto proteinů má funkce překrývající se s jinými a rovněž své jedinečné spektrum funkcí. Kromě schopnosti stimulovat proliferaci vaskulárních endotheliálních buněk je jak FGF-1, tak FGF-2 chemotaktický pro endotheliální buňky a u FGF-2 se zjistilo, že umožňuje endotheliálním buňkám pronikat základovou membránou.

V souladu s těmito vlastnostmi má FGF-1 i FGF-2 schopnost stimulovat angiogenesi. Dalším významným rysem těchto růstových faktorů je jejich schopnost podporovat hojení ran. Mnozí další členové skupiny FGF sdílejí s FGF-1 a FGF-2 podobné účinky, jako je podpora angiogenese a hojení ran. U některých členů genové rodiny FGF se ukázalo, že indukují tvorbu mesodermu a modulují diferenciaci neuronových buněk, adipocytů a buněk kosterního svalstva.

Kromě těchto biologických aktivit v normálních tkáních se proteiny FGF účastní podpory tumorigenese v karcinomech a sarkomech podporováním vaskularizace nádorů a jako transformující proteiny, je-li jejich exprese deregulována.

Skupina FGF v současné době sestává z osmi strukturně příbuzných polypeptidů. Geny pro každý z nich byly klonovány a sekvenovány. Dva ze členů, FGF-1 a FGF-2, byly charakterizovány pod různými názvy, ale nejčastěji jako bazický, resp. kyselý fibroblastový růstový faktor. Normální genové produkty ovlivňují obecnou proliferační schopnost většiny buněk odvozených od mesodermu a neuroektodermu. Jsou schopny indukovat angiogenesi *in vivo* a mohou hrát významnou roli v raném vývoji (Burgess, W.H. a Maciag, T., Annu. Rev. Biochem., 58:575-606 (1989)).

Eukaryotický expresní vektor, kódující vylučovanou formu FGF-1, byl zaveden genovým přenosem do prasečích tepen. Tento model definuje funkci genu v arteriální stěně *in vivo*. Expze FGF-1 vyvolala v prasečích tepnách 21 dní po genovém přenosu intimální zesílení (Nabel, E.G., a d., Nature, 362:844-6 (1993)). Dále bylo demonstrováno, že bazický fibroblastový růstový faktor může regulovat růst a progresi gliomů nezávisle na své roli při angiogenesi nádorů a že toto působení může vyžadovat uvolňování nebo vylučování bazického fibroblastového růstového faktoru (Morrison, R.S. a d., J. Neurosci. Res., 34:502-9 (1993)).

Fibroblastové růstové faktory, jako je bazický FGF, se dále účastní růstu buněk Kaposiho sarkomu *in vitro* (Huang, Y.Q., a d., J. Clin. Invest., 91:1191-7 (1993)). Dále byla sekvence cDNA, kódující lidský bazický fibroblastový růstový faktor, klonována za transkripční promotor, rozpoznávaný RNA polymerasou bakteriofága T7. Bylo zjištěno, že takto získané bazické fibroblastové růstové faktory mají v testech mitogenicity, syntézy plasminogenového aktivátoru a angiogene biologickou aktivitu nerozlišitelnou od lidského placentárního fibroblastového růstového faktoru (Squires, C.H., a d., J. Biol. Chem. 263:16297-302 (1988)).

Patent US 5,155.214 popisuje v podstatě čisté savčí bazické fibroblastové růstové faktory a jejich výrobu. Je uvedena sekvence aminokyselin hovězího a lidského bazického fibroblastového růstového faktoru, stejně jako sekvence DNA, kódující polypeptid hovězího faktoru.

Polypeptid podle vynálezu byl předběžně identifikován jako člen skupiny FGF v důsledku homologie sekvence aminokyselin s ostatními členy skupiny FGF.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou nové maturované polypeptidy, tvořené FGF-10 a jeho biologicky aktivními a diagnosticky nebo terapeuticky použitelnými fragmenty, analogy a deriváty. Polypeptidy podle vynálezu jsou lidského původu.

Předmětem vynálezu jsou rovněž izolované molekuly nukleových kyselin kódující FGF-10, zahrnující mRNA, DNA, cDNA, genomovou DNA a jejich antimediatorové analogy a biologicky aktivní a diagnosticky nebo terapeuticky využitelné fragmenty.

Dále je předmětem vynálezu způsob výroby takového polypeptidu rekombinačními metodami s použitím rekombinačních

vektorů, jako jsou klonovací a expresní plasmidy, použitelné při rekombinační výrobě proteinů FGF-10, a rekombinačních prokaryotických a/nebo eukaryotických hostitelských buněk zahrnujících sekvenci nukleové kyseliny lidského FGF-10.

Dále je předmětem vynálezu způsob použití takového polypeptidu nebo polynukleotidu kódujícího takový peptid k terapeutickým účelům, například k podpoře hojení ran, popálenin a vředů, k prevenci neuronálního poškození v důsledku neuronálních poruch a k prevenci stárnutí pokožky a úbytku vlasů.

Dále jsou předmětem vynálezu protilátky proti těmto polypeptidům.

Dále jsou předmětem vynálezu antagonisté proti těmto polypeptidům, kterých je možno použít k inhibici působení takového polypeptidu, například při léčbě nádorů a hypervaskulárních onemocnění.

Dále jsou předmětem vynálezu sondy nukleových kyselin, zahrnující molekuly nukleových kyselin o dostatečné délce pro specifickou hybridizaci se sekvencemi lidského FGF-10.

Dále jsou předmětem vynálezu diagnostické testy pro detekci onemocnění nebo náchylnosti k onemocněním, souvisejícím s mutacemi sekvencí nukleových kyselin FGF-10 nebo s hyperexpresí polypeptidů kódovaných těmito sekvencemi.

Dále je předmětem vynálezu způsob použití těchto polypeptidů nebo polynukleotidů kódujících tyto polypeptidy pro účely *in vitro*, související s vědeckým výzkumem, syntézou DNA a výrobou vektorů DNA.

Vynález se v jednom aspektu týká izolovaných molekul nukleových kyselin (polynukleotidů), které kódují maturovaný polypeptid, jehož odvozená sekvence aminokyselin je zobrazena na obr. 1 (SEQ ID NO 2), nebo maturovaný polypeptid kódovaný cDNA klonu uloženého 4.3.1994 u ATCC pod číslem 75696.

Polynukleotid podle vynálezu byl objeven nejdříve v knihovně cDNA, odvozené od 8týdenní lidské tkáně časného stadia a pak byla nalezena cDNA plné délky v knihovně odvozené od lidské mandle. Je strukturně příbuzný všem členům rodiny genů fibroblastového růstového faktoru a obsahuje otevřený čtecí rámec kódující polypeptid o 181 aminokyselinách. Mezi vrcholné shody patří: 1) 37% identita a 67% sekvenční podobnost s FGF-9, izolovaným z mozku, v úseku 129 aminokyselin; 2) 36% identita a 64% podobnost s FGF-7 (keratinocytový růstový faktor) v oblasti 121 aminokyselin; 3) 33% identita a 55% podobnost s FGF-1 (kyselý FGF) v úseku 110 aminokyselin. Kromě toho je v polypeptidu podle vynálezu zachována signatura skupiny FGF/HBGF, tj. GXLX(S,T,A,G)X6(D,E)CXFXE (X znamená zbytek kterékoli aminokyseliny, (D,E) znamená buď zbytek D nebo E, X6 znamená 6 jakýchkoli zbytků aminokyselin).

Polynukleotid podle vynálezu může být ve formě RNA nebo ve formě DNA, přičemž DNA zahrnuje cDNA, genomovou DNA a syntetickou DNA. DNA může být dvouřetězcová nebo jednořetězcová. Kódující sekvence, která kóduje maturovaný polypeptid, může být identická s kódující sekvencí uvedenou na obr. 1 (SEQ ID NO 1) nebo s kódující sekvencí uloženého klonu, nebo to může být odlišná kódující sekvence v důsledku repetice nebo degenerace genetického kódu, která kóduje tentýž maturovaný polypeptid jako DNA na obr. 1 (SEQ ID NO 1) nebo uložená cDNA.

Polynukleotid, který kóduje maturovaný polypeptid podle obr. 1 (SEQ ID NO 2) nebo maturovaný polypeptid kódovaný uloženou cDNA, může zahrnovat: pouze kódující sekvenci pro maturovaný polypeptid; kódující sekvenci pro maturovaný polypeptid a další kódující sekvenci, jako je vedoucí nebo sekreční sekvence nebo sekvence proproteinu; kódující sekvenci pro maturovaný polypeptid (a popřípadě další kódující sekvenci) a nekódující sekvenci, jako jsou introny

nebo nekódující sekvence 5' a/nebo 3' kódující sekvence pro maturovaný polypeptid.

Výraz „polynukleotid kódující polypeptid“ zahrnuje polynukleotid, který obsahuje pouze kódující sekvenci pro polypeptid, stejně jako polynukleotid, který obsahuje další kódující a/nebo nekódující sekvenci.

Předmět vynálezu se dále týká variant výše popsaných polynukleotidů, které kódují fragmenty, analogy a deriváty polypeptidu, majícího odvozenou sekvenci aminokyselin podle obr. 1 (SEQ ID NO 2), nebo polypeptidu kódovaného cDNA uloženého klonu. Variantami polynukleotidu mohou být přirozeně se vyskytující alelické varianty polynukleotidu nebo varianty polynukleotidu, přirozeně se nevyskytující.

Vynález tedy zahrnuje polynukleotidy kódující tentýž maturovaný polypeptid, jaký je znázorněn na obr. 1 (SEQ ID NO 2), nebo tentýž maturovaný polypeptid, jaký je kódován cDNA uloženého klonu, stejně jako varianty těchto polynukleotidů, které kódují fragment, derivát nebo analog polypeptidu podle obr. 1 (SEQ ID NO 2) nebo polypeptid kódovaný cDNA uloženého klonu. Takové nukleotidové varianty zahrnují deleční, substituční a adiční nebo inserční varianty.

Jak výše uvedeno, polynukleotid může mít kódující sekvenci, kterou je přirozeně se vyskytující alelická varianta kódující sekvence znázorněné na obr. 1 (SEQ ID NO 1) nebo kódující sekvence uloženého klonu. Jak známo, alelická varianta je alternativní forma polynukleotidové sekvence, která může mít substituci, deleci nebo adici jednoho nebo více nukleotidů, která podstatně nemění funkci kódovaného polypeptidu.

Vynález zahrnuje rovněž polynukleotidy, kde může být kódující sekvence maturovaného polypeptidu fúzována v tomtéž čtecím rámci s polynukleotidovou sekvencí, která napomáhá expresi a sekreci polypeptidu z hostitelské buňky, například s vedoucí sekvencí, která funguje jako sekreční sekvence pro

kontrolu transportu polypeptidu z buňky. Polypeptid mající vedoucí sekvenci je preprotein a jeho vedoucí sekvence může být odštěpena hostitelskou buňkou za vzniku maturované formy polypeptidu. Polynukleotidy mohou rovněž kódovat proprotein, kterým je maturovaný protein plus přidané 5'-aminokyselinové zbytky. Maturovaný protein, který má prosekvenci, je proprotein a jedná se o inaktivní formu proteinu. Jakmile je prosekvence odštěpena, zbývá aktivní maturovaný protein.

Polynukleotid podle vynálezu tedy například může kódovat maturovaný protein nebo protein s prosekvencí nebo protein s prosekvencí i presekvencí (vedoucí sekvencí).

Polynukleotidy podle vynálezu mohou mít rovněž kódující sekvenci, fúzovanou v rámci s markerovou sekvencí, která umožňuje čištění polypeptidu podle vynálezu. Markerovou sekvencí může být hexahistidinový úsek, dodaný vektorem pQE-9, umožňující čištění maturovaného polypeptidu, fúzovaného s markerem, v případě bakteriálního hostitele, nebo například může být markerovou sekvencí hemagglutininový (HA) úsek, používá-li se savčí hostitel, například buňky COS-7. Marker HA odpovídá epitopu, odvozenému od proteinu chřipkového hemagglutininu (Wilson, I., a d., Cell, 37:767 (1984)).

Vynález se dále týká polynukleotidů, které hybridizují s výše popsányi sekvencemi, je-li mezi sekvencemi alespoň 50%, přednostně 70% identita. Vynález se zejména týká polynukleotidů, které hybridizují s výše popsányi polynukleotidy za striktních podmínek. Výraz „striktní podmínky“ zde znamená, že k hybridizaci dojde pouze při alespoň 95%, přednostně alespoň 97% identitě mezi sekvencemi. Polynukleotidy, které hybridizují s výše popsányi polynukleotidy ve výhodném provedení, si uchovávají v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako maturovaný polypeptid kódovaný cDNA podle obr. 1 (SEQ ID NO 1) nebo uloženou cDNA.

Uváděné uložené vzorky budou uchovávány podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů k účelům patentového řízení. Tyto vzorky jsou uloženy pouze pro pohodlnost a nepředstavují připuštění, že by uložení bylo nutné podle § 112 USC 35. Sekvence polynukleotidů obsažených v uložených materiálech, stejně jako sekvence aminokyselin polypeptidů, které jsou jimi kódovány, jsou zde zahrnuty formou odkazu a jsou rozhodující v případě jakéhokoli konfliktu se zde uvedeným popisem sekvencí. K výrobě, použití nebo prodeji uložených materiálů může být vyžadována licence a tímto se žádná taková licence neuděluje.

Vynález se dále týká polypeptidu FGF-10, který má odvozenou sekvenci aminokyselin podle obr. 1 (SEQ ID NO 2) nebo který má sekvenci aminokyselin kódovanou uloženou cDNA, stejně jako fragmentů, analogů a derivátů takového polypeptidu.

Výrazy „fragment“, „derivát“ a „analog“ s odkazem na polypeptid podle obr. 1 (SEQ ID NO 2) nebo polypeptid kódovaný uloženou cDNA znamenají polypeptid, který si uchovává v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako tento polypeptid. Analog tedy zahrnuje proprotein, který může být aktivován odštěpením proproteinové části za vzniku aktivního maturovaného polypeptidu.

Polypeptidem podle vynálezu může být rekombinační polypeptid, přírodní polypeptid nebo syntetický polypeptid, přednostně rekombinační polypeptid.

Fragment, derivát nebo analog polypeptidu podle obr. 1 (SEQ ID NO 2) nebo polypeptidu kódovaného uloženou cDNA může být (i) takový, v němž je jeden nebo více aminokyselinových zbytků nahrazeno konzervativním nebo nekonzervativním aminokyselinovým zbytkem (přednostně konzervativním aminokyselinovým zbytkem) a tímto dosazeným aminokyselinovým zbytkem může nebo nemusí být zbytek kódovaný genetickým

kódem, nebo (ii) takový, v němž jeden nebo více aminokyselinových zbytků obsahuje substituentovou skupinu, nebo (iii) takový, v němž je maturovaný polypeptid fúzován s jinou sloučeninou, jako je sloučenina zvyšující poločas polypeptidu (například polyethylenglykol), nebo (iv) takový, v němž jsou k maturovanému peptidu fúzovány další aminokyseliny, jako je vedoucí nebo sekreční sekvence nebo sekvence, která se používá pro čištění maturovaného polypeptidu nebo proproteinové sekvence. Tyto fragmenty, deriváty a analogy se považují za spadající do rozsahu znalostí odborníka na základě zde uvedených údajů.

Polypeptidy a polynukleotidy podle vynálezu se přednostně vyskytují v izolované formě a přednostně jsou čištěny do homogenity.

Výraz „izolovaný“ znamená, že materiál je oddělen od svého původního prostředí (například přirozeného prostředí, vyskytuje-li se přirozeně). Například přirozeně se vyskytující polynukleotid nebo polypeptid přítomný v živém živočichovi se neizoluje, ale tentýž polynukleotid nebo DNA nebo polypeptid, oddělený od některých nebo všech doprovodných materiálů v přirozeném systému, se izoluje. Izoluje se i v případě, že je polynukleotid součástí vektoru a/nebo když je polynukleotid nebo polypeptid součástí směsi, protože takový vektor nebo směs není součástí jeho přirozeného prostředí.

Vynález se týká rovněž vektorů, která zahrnují polynukleotidy podle vynálezu, hostitelských buněk, které jsou podrobeny genetické manipulaci pomocí vektorů podle vynálezu a výroby polypeptidů podle vynálezu rekombinačními metodami.

Hostitelské buňky mohou být podrobeny genetické manipulaci (transdukci nebo transformaci nebo transfekci) pomocí vektorů podle vynálezu, kterými mohou být například klonovací vektory nebo expresní vektory. Vektor může být

například ve formě plasmidu, virové částice, fága atd. Takto manipulované hostitelské buňky mohou být kultivovány v konvenčním živném médiu, příslušně modifikovaném pro aktivaci promotorů, selekci transformantů nebo amplifikaci genů FGF-10. Podmínky kultivace, jako je teplota, pH apod., jsou stejné, jaké byly použity u hostitelské buňky zvolené pro expresi, a jsou běžnému odborníkovi zřejmé.

Polynukleotid podle vynálezu může být použit pro výrobu peptidu rekombinačními metodami. Například může být polynukleotidová sekvence zahrnuta do jednoho z různých expresních médií, zejména vektorů nebo plasmidů pro expresi polypeptidu. Tyto vektory zahrnují chromosomální, nechromosomální a syntetické sekvence DNA, například deriváty SV40; bakteriální plasmidy; fágovou DNA; kvasinkové plasmidy; vektory odvozené od kombinací plasmidů a fágové DNA, virální DNA, jako je virus vakcinie, adenovirus, virus drůbežích neštovic a pseudorabies. Je však možno použít i jakéhokoli jiného vektoru nebo plasmidu, pokud jsou v hostiteli replikovatelné a životaschopné.

Příslušné sekvence DNA mohou být do vektoru vloženy různými postupy. Obecně se sekvence DNA vkládá známými postupy do příslušných míst restričních endonukleas. Tyto a další postupy spadají do rozsahu znalostí odborníka.

Sekvence DNA v expresním vektoru je operativně navázána k příslušné řídící sekvenci(ím) (promotoru) pro řízení syntézy mRNA. Jako příklady takovýchto promotorů je možno uvést promotor LTR nebo SV40, lac nebo trp E. coli, promotor P_L fága lambda a další promotory, o nichž je známo, že řídí expresi genů v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách nebo jejich virech. Expresní vektor obsahuje také místo vazby ribosomů pro iniciaci translace a terminátor transkripce. Vektor může rovněž obsahovat příslušné sekvence pro amplifikační expresi.

Expresní vektory dále přednostně obsahují gen poskytující fenotypický rys pro selekci transformovaných hostitelských buněk, jako je dihydrofolát reduktasa nebo neomycinová rezistence pro eukaryotickou buněčnou kulturu nebo tetracyklinová nebo ampicilinová rezistence v *E. coli*.

Vektor, obsahující výše popsanou příslušnou sekvenci DNA stejně jako příslušný promotor nebo řídící sekvenci, může být použit k transformaci vhodného hostitele, a tak umožnit expresi proteinu hostitelem. Jako příklady vhodných hostitelů je možno uvést bakteriální buňky, jako je *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; buňky plísní, jako jsou kvasinky; hmyzí buňky, jako je *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sf9; zvířecí buňky, jako jsou CHO, COS nebo Bowesův melanom; adenoviry, rostlinné buňky atd. Výběr vhodného hostitele se považuje za zřejmý pro odborníka na základě zde uvedených údajů.

Vynález konkrétně rovněž zahrnuje rekombinační konstrukty, zahrnující jednu nebo více výše podrobně popsaných sekvencí. Konstrukty obsahují vektor, jako je plasmid nebo virální vektor, do něhož byla vložena sekvence podle vynálezu v přímé nebo zpětné orientaci. Ve výhodném provedení vynálezu konstrukt dále obsahuje regulační sekvence, zahrnující například promotor, operativně vázaný k sekvenci. Odborníkovi jsou známy a obchodně jsou dostupné různé vhodné vektory a promotory. Jako příklady se uvádějí tyto vektory: Bakteriální: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryotické: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Mohou však být použity jakékoli další vektory nebo plasmidy, pokud jsou v hostiteli replikovatelné a životaschopné.

Promotorové oblasti mohou být z kteréhokoli požadovaného genu selektovány pomocí vektorů CAT (chloramfenikol

transferasa) nebo jiných vektorů se selektovatelnými markery. Dvěma vhodnými vektory jsou pKK232-8 a pCM7. Konkrétní jmenovité bakteriální promotory zahrnují lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L a trp. Eukaryotické promotory zahrnují bezprostřední časný CMV, HSV thymidin kinasu, časný a pozdní SV40, LTR z retrovirů a myši metallothionein-I. Volba vhodného vektoru a promotoru spadá zcela do úrovně běžných znalostí v oboru.

V dalším provedení se vynález týká hostitelských buněk obsahujících výše popsaný konstrukt. Hostitelskou buňkou může být vyšší eukaryotická buňka, jako je savčí buňka, nebo nižší eukaryotická buňka, jako je kvasinková buňka, nebo jí může být prokaryotická buňka, jako je bakteriální buňka. Zavedení konstruktů do hostitelské buňky může být prováděno transfekcí fosforečnanem vápenatým, transfekcí zprostředkovanou DEAE-Dextranem nebo elektroporací (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986)).

Konstrukty v hostitelských buňkách mohou být použity běžným způsobem k výrobě genového produktu kódovaného rekombinační sekvencí. Alternativně je možno polypeptidy podle vynálezu vyrábět synteticky pomocí konvenčních peptidových syntetizátorů.

Maturované proteiny mohou být exprimovány v savcích buňkách, kvasinkách, bakteriích nebo dalších buňkách pod kontrolou příslušných promotorů. K výrobě těchto proteinů mohou být rovněž použity bezbuněčné translační systémy s použitím RNA, odvozených od konstruktů DNA podle vynálezu. Vhodné klonovací a expresní vektory pro použití v prokaryotických a eukaryotických hostitelích jsou popsány v Sambrook a d., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, druhé vydání, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), kterážto publikace je zde zahrnuta jako odkaz.

Transkripce DNA, kódující polypeptidy podle vynálezu, vyššími eukaryoty, se zvýší zavedením zesilovací

(enhancerové) sekvence do vektoru. Enhancery jsou elementy DNA, působící v poloze *cis*, obvykle o asi 10 až 300 bp, které působí na promotor za účelem zvýšení jeho transkripce. Jako příklady je možno uvést enhancer SV40 na pozdní straně počátku replikace (bp 100 až 270), enhancer časného promotoru cytomegaloviru, polyomový enhancer na pozdní straně počátku replikace a adenovirové enhancery.

Rekombinační expresní vektory obecně obsahují počátek replikace a selektovatelné markery, umožňující transformaci hostitelské buňky, například gen ampicilinové rezistence *E. coli* a gen *S. cerevisiae* TRP1, a promotor odvozený od vysoce exprimovaného genu k řízení transkripce strukturní sekvence po směru exprese. Takové promotory mohou být odvozeny od operonů kódujících glykolytické enzymy, jako je mezi jinými 3-fosfoglycerát kinasa (PGK), faktor α , kyselá fosfatasa nebo proteiny teplotního šoku. Heterologní strukturní sekvence je nastavena do příslušné fáze s translační, iniciační a terminační sekvencí. Případně může heterologní sekvence kódovat fúzní protein, zahrnující N-terminální identifikační peptid dodávající požadované charakteristiky, například stabilizaci nebo zjednodušené čištění exprimovaného rekombinačního produktu.

Vhodné expresní vektory pro bakteriální použití se konstruuji vložení strukturní sekvence DNA, kódující požadovaný protein, spolu s vhodnými translačními, iniciačními a terminačními signály v operativně čtecí fázi s funkčním promotorem. Vektor obsahuje jeden nebo více fenotypických selektovatelných markerů a počátek replikace, aby bylo zajištěno zachování vektoru, a je-li to žádoucí, dosaženo amplifikace v hostiteli. Vhodní prokaryotičtí hostitelé pro transformaci zahrnují *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* a různé druhy rodů *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Staphylococcus*, avšak je možno podle potřeby volit i jiné.

Jako neomezuující příklady vhodných expresních vektorů pro bakteriální použití je možno uvést vektory obsahující selektovatelný marker a bakteriální počátek replikace, odvozené od komerčně dostupných plasmidů, zahrnujících genetické elementy známého klonovacího vektoru pBR322 (ATCC 37017). Takové komerční vektory zahrnují například pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko) a GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Tyto „řetězcové“ sekce pBR322 jsou kombinovány v příslušném promotorech a strukturní sekvenci, která má být exprimována.

Po transformaci vhodného hostitelského kmene a kultivaci hostitelského kmene na příslušnou hustotu buněk se zvolený promotor dereprimuje vhodnými prostředky (například změnou teploty nebo chemickou indukci) a buňky se ještě nějakou dobu kultivují.

Buňky se izolují nejčastěji odstředěním, rozruší fyzikálními nebo chemickými prostředky a vzniklý surový extrakt se uchová pro další čištění.

Mikrobiální buňky, používané při expresi proteinů, mohou být rozrušeny jakoukoli běžnou metodou, například cykly zmrazování a rozmrazování, sonifikací, mechanickým rozrušením nebo použitím lyzačních prostředků.

K expresi rekombinačního proteinu mohou být rovněž použity různé savčí buněčné kultivační systémy. Příklady savčích expresních systémů zahrnují linie COS-7 opičích ledvinových fibroblastů, popsané v Gluzman, Cell, 23:175 (1981), a další buněčné linie schopné exprese kompatibilního vektoru, například buněčné linie C127, 3T3, CHO, HeLa a BHK. Savčí expresní vektory obsahují počátek replikace, vhodný promotor a enhancer a také veškerá potřebná místa vazby ribosomů, polyadenylační místo, místa donorů a akceptorů sestřihu, terminační sekvence transkripce a 5'-lemující nepřepsané sekvence. K získání požadovaných nepřepsaných genetických elementů je možno použít sekvenci DNA, odvozenou

od virálního genomu SV40, například počátek SV40, časný promotor, enhancer, sestřih a polyadenylační místa.

FGF-10 může být z rekombinačních buněčných kultur izolován a čištěn dosud známými metodami, zahrnujícími srážení síranem amonným nebo ethanolem, kyselou extrakci, aniontově nebo kationtově výměnnou chromatografií, chromatografií na fosfocelulóze, chromatografií s hydrofobní interakcí, afinitní chromatografií, hydroxyapatitovou chromatografií a lektinovou chromatografií. Je možno použít stupňů opětného skládání proteinu, je-li to nutné pro kompletaci konfigurace maturovaného proteinu. Pro konečné čištění je možno použít vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Polypeptidy podle vynálezu mohou představovat přirozeně čištěný produkt nebo produkt chemických syntetických postupů nebo produkt získaný rekombinační technologií z prokaryotického nebo eukaryotického hostitele (například bakteriálními, kvasinkovými, vyššími rostlinnými, hmyzími a savčími buňkami v kultuře). V závislosti na hostiteli použitém v rekombinační produkční technologii mohou být polypeptidy podle vynálezu glykosylovány savčími nebo jinými eukaryotickými uhlohydráty nebo mohou být neglykosylovány. Polypeptidy podle vynálezu mohou dále obsahovat počáteční zbytek aminokyseliny methioninu.

Polypeptid podle vynálezu může být v důsledku schopnosti stimulovat vaskulární endotheliální buněčný růst použit při ošetření za účelem stimulace revaskularizace ischemických tkání v případě různých chorobných stavů, jako je trombóza, arterioskleróza a další kardiovaskulární choroby.

FGF-10 může být rovněž použit k ošetřování ran v důsledku poranění, popálenin, pooperačních oprav tkáně a vředů, poněvadž má schopnost mitogenně působit na různé typy buněk, jako jsou fibroblastové buňky a buňky kosterního svalstva.

FGF-10 může být použit rovněž k ošetřování a prevenci neuronálního poškození, ke kterému dochází při určitých neuronálních poruchách nebo neurovegetativních stavech, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a komplex související s AIDS. FGF-10 má schopnost stimulovat růst chondrocytů, a proto může být použit k podpoře regenerace kostí a periodontu a napomáhat při tkáňových transplantátech a kostních štěpech.

FGF-10 může být rovněž použit k prevenci stárnutí pokožky v důsledku opalování pomocí stimulace růstu keratinocytů.

FGF-10 může být použit i k prevenci úbytku vlasů, poněvadž aktivuje buňky vlasů a podporuje růst melanocytů. Na stejném principu stimuluje FGF-10 růst a diferenciaci hematopoietických buněk a buněk kostní dřeně, je-li použit v kombinaci s dalšími cytokiny.

FGF-10 může být rovněž použit k uchovávání orgánů před transplantací nebo pro uchovávání buněčné kultury primárních tkání.

Vynález se dále týká způsobu použití těchto polypeptidů nebo polynukleotidů kódujících tyto polypeptidy pro účely *in vitro* související s vědeckým výzkumem, syntézou DNA, výrobou vektorů DNA a pro účel získávání diagnostických a terapeutických prostředků pro ošetřování lidských onemocnění.

Fragmenty plné délky genu FGF-10 mohou být použity jako hybridizační sonda pro knihovnu cDNA za účelem izolace plné délky genu FGF-10 a k izolaci dalších genů, které s ním mají vysokou sekvenční podobnost nebo které mají podobnou biologickou aktivitu. Sondy tohoto typu mají obvykle alespoň 20 bází. Přednostně však sondy obsahují alespoň 30 bází a obvykle nepřesahují 50 bází, i když mohou mít i větší počet bází. Sonda může být použita také k identifikaci klonu cDNA odpovídajícího plné délce transkriptu a genomického klonu nebo klonů, které obsahují kompletní gen FGF-10 včetně

regulačních a promotorových oblastí, exonů a intronů. Příkladem screeningu je izolace kódující oblasti genu FGF-10 s použitím známé sekvence DNA k syntéze oligonukleotidové sondy. Značené oligonukleotidy, mající komplementární sekvenci k sekvenci genu podle vynálezu, se používají ke screeningu knihovny lidské cDNA, genomové DNA nebo mRNA za účelem zjištění, s kterými členy knihovny sonda hybridizuje.

Vynález poskytuje způsob identifikace receptorů pro polypeptid FGF-10. Gen kódující receptor může být identifikován různými metodami, známými odborníkům, například vyhledáváním ligandů a tříděním FACS (Coligan a d., *Current Protocols in Immun.*, kapitola 5 (1991)). Jestliže se připravuje polyadenylovaná RNA z buňky odpovídající polypeptidům, používá se přednostně expresní klonování a knihovna cDNA, vytvořená z této RNA, se rozdělí do souborů a použije k transfekci buněk COS nebo jiných buněk, které neodpovídají polypeptidům. Transfikované buňky, které se pěstují na skleněných podložních sklíčkách, se vystaví značeným polypeptidům. Polypeptidy mohou být značeny různými prostředky, zahrnujícími jodaci nebo zabudování rozpoznávacího místa pro místně specifickou proteinkinasu. Po fixaci a inkubaci se sklíčka podrobí autoradiografické analýze. Identifikují se pozitivní soubory a připraví se podsoubory, které se retransfikují s použitím procesu iterativního seskupování a rescreeningu, čímž se nakonec získá jednotlivý klon, který kóduje přepokládaný receptor.

Jako alternativní přístup k identifikaci receptorů mohou být značené polypeptidy fotoafinitně navázány na buněčnou membránu nebo extraktové preparáty, které exprimují receptorovou molekulu. Zesítný materiál se rozštěpí pomocí analýzy PAGE a vytaví rentgenovému filmu. Značený komplex, obsahující receptory polypeptidů, může být vyříznut, rozštěpen na peptidové fragmenty a podroben mikrosekvenování proteinů. Sekvence aminokyselin, získaná mikrosekvenováním, se použije ke konstrukci sady degenerovaných

oligonukleotidových sond pro screening knihovny cDNA za účelem identifikace genů kódujících předpokládané receptory.

Vynález poskytuje způsob screeningu za účelem identifikace sloučenin, které modulují působení FGF-10. Příklad takového testu zahrnuje kombinaci savčí fibroblastové buňky, FGF-10, sloučeniny podrobované screeningu a $^3\text{[H]}$ -thymidinu za podmínek buněčné kultivace, za nichž by fibroblastová buňka normálně proliferovala. Je možno provést kontrolní test v nepřítomnosti sloučeniny podrobované screeningu a porovnat s velikostí proliferace fibroblastů v přítomnosti testované sloučeniny za účelem stanovení, zda sloučenina stimuluje proliferaci keratinocytů stanovením příjmu $^3\text{[H]}$ thymidinu v obou případech.

Za účelem screeningu na antagonisty je možno připravit stejný test a měří se schopnost sloučeniny bránit proliferaci fibroblastů a provede se stanovení antagonistických vlastností. Velikost proliferace fibroblastových buněk se měří kapalnou scintilační chromatografií, již se měří zabudování $^3\text{[H]}$ thymidinu.

V jiné metodě se savčí buňka nebo membránový preparát, exprimující receptor FGF-10, inkubuje se značeným FGF-10 v přítomnosti sloučeniny. Pak je možno měřit schopnost sloučeniny podporovat nebo blokovat tuto interakci. Alternativně se měří odpověď druhého známého messengerového systému po interakci FGF-10 a receptoru a porovnává se v přítomnosti a nepřítomnosti sloučeniny. Takového druhé messengerové systémy zahrnují, aniž by se na ně omezovaly, cAMP guanylátcyklastu, iontové kanálky nebo hydrolýzu fosfoinositidu.

Jako příklady potenciálních antagonistů FGF-10 je možno uvést protilátku nebo v některých případech oligonukleotid, který se váže na polypeptid. Alternativně může být potenciálním antagonistou FGF-10 mutantní forma FGF-10, která se váže na receptory FGF-10, avšak není vyvolána žádná

odpověď druhého messengeru, a tudíž je účinek FGF-10 efektivně blokován.

Dalším potenciálním antagonistou FGF-10 je antimediatorový konstrukt, připravený antimediatorovou technologií. Antimediatorovou technologií je možno použít ke kontrole exprese genů prostřednictvím tvorby trojitě spirály nebo antimediatorové DNA nebo RNA, kteréžto obě metody jsou založeny na vazbě polynukleotidu na DNA nebo RNA. Například 5'-kódující část polynukleotidové sekvence, která kóduje maturované polypeptidy podle vynálezu, se použije ke konstrukci antimediatorového oligonukleotidu RNA o délce asi 10 až 40 párů bází. Navrhne se oligonukleotid DNA tak, aby byl komplementární k oblasti genu, účastníci se transkripce (trojitá spirála, viz Lee a d., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney a d., Science, 241:456 (1988); a Dervan a d., Science, 251: 1360 (1991)), a tak bránil transkripci a produkci FGF-10. Antimediatorový oligonukleotid RNA hybridizuje *in vivo* s mRNA a blokuje translaci molekuly mRNA do polypeptidu FGF-10 (proti smyslu; Okano, J., Neurochem., 56:560 (1991);, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Výše popsané oligonukleotidy mohou být rovněž dodány do buněk tak, aby byla *in vivo* exprimována antimediatorová RNA nebo DNA k inhibici produkce FGF-10.

Potenciální antagonisté FGF-10 zahrnují malé molekuly, které se vážou na vazebná místa receptoru FGF-10 a okupují je, a tak způsobují nepřístupnost receptoru pro FGF-10, takže je zabráněno normální biologické aktivitě. Příklady malých molekul zahrnují, avšak neomezují se na ně, malé peptidy nebo molekuly podobné peptidům.

Antagonistů FGF-10 je možno používat k inhibici růstu buněk a proliferačních účinků FGF-10 na neoplastické buňky a tkáně, a tudíž k retardaci nebo prevenci abnormálního růstu a proliferace buněk, například růstu nádorů.

Antagonistů FGF-10 je možno použít rovněž k prevenci hypervaskulárních onemocnění a k prevenci proliferace epiteliálních buněk čočky po chirurgii extrakapsulární katarakty.

Antagonisté mohou být používáni ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem, například dále popsáním.

Polypeptidy, agonisté a antagonisté podle vynálezu mohou být používáni v kombinaci s vhodným farmaceutickým nosičem ve formě farmaceutického přípravku. Takové přípravky zahrnují terapeuticky účinné množství polypeptidu, agonisty nebo antagonisty a farmaceuticky přijatelný nosič nebo vehikulum. Takovýto nosič zahrnuje, avšak neomezuje se na ně, solný roztok, pufrovaný solný roztok, dextrózu, vodu, glycerol, ethanol a jejich kombinace. Formulace by měla odpovídat způsobu podávání.

Vynález poskytuje rovněž farmaceutickou soupravu nebo kit, zahrnující jednu nebo více nádobek naplněných jednou nebo více složkami farmaceutických přípravků podle vynálezu. K této nádobce (nádobkám) může být připojeno oznámení ve formě předepsané vládní agenturou regulující výrobu, používání nebo prodej farmaceutických nebo biologických produktů, které odráží souhlas této agentury s výrobou, používáním nebo prodejem pro humánní aplikaci. Kromě toho mohou být polypeptidy, agonisté a antagonisté podle vynálezu používáni ve spojení s dalšími terapeutickými sloučeninami.

Farmaceutické přípravky mohou být podávány běžným způsobem, například orální, topickou, intravenózní, intraperitoneální, intramuskulární, subkutánní, intranasální nebo intradermální cestou. Farmaceutické přípravky jsou podávány v množství, které je účinné při léčbě a/nebo profylaxi specifické indikace. Obecně se podávají v množství alespoň asi 10 $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti a ve většině případů se podávají v množství nepřesahujícím asi 8 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Ve většině případů činí dávkování asi 10

$\mu\text{g/kg}$ až asi 1 mg/kg tělesné hmotnosti denně s přihlédnutím ke způsobu podávání, symptomům atd. V konkrétním případě topické aplikace se podávají přednostně dávky asi $0,1 \mu\text{g}$ až 9 mg na cm^2 .

Polypeptidy FGF-10 a agonisté a antagonisté, kteří jsou polypeptidy, mohou být rovněž používáni podle vynálezu expresí takového polypeptidu *in vivo*, která se často označuje jako „genová terapie“.

Tak mohou být buňky například podrobeny genové manipulaci s polynukleotidem (DNA nebo RNA), kódujícím polypeptid, *ex vivo*, a pak dodány pacientovi, který má být léčen tímto polypeptidem. Takové metody jsou známy. Buňky mohou být například podrobeny známým způsobem manipulaci s použitím retrovirální částice obsahující RNA, kódující polypeptid podle vynálezu

Podobně mohou být buňky manipulovány *in vivo* pro expresi polypeptidu *in vivo*, například známými metodami. Jak je známo, za účelem manipulace buněk *in vivo* a exprese polypeptidu *in vivo* může být podávána pacientovi produkční buňka pro produkci retrovirální částice obsahující RNA, kódující polypeptid podle vynálezu. Tyto a další způsoby podávání polypeptidu podle vynálezu jsou pro odborníka zřejmé z údajů tohoto popisu. Například expresní vehikulum pro manipulaci buněk může být jiné než retrovirální částice, například adenovirus, který může být použit k manipulaci buněk *in vivo* v kombinaci s vhodným nosným vehikulem.

Vynález se rovněž týká použití genu FGF-10 jako součásti diagnostického testu pro detekci onemocnění nebo náchylnosti k onemocněním souvisejícím s přítomností mutací v sekvenci nukleových kyselin FGF-10.

Jednotlivci nesoucí mutace v genu FGF-10 mohou být detekováni na úrovni DNA různými metodami. Nukleové kyseliny pro diagnózu mohou být získány z buněk pacienta, například

z krve, moči, slin, materiálu tkáňové biopsie a autopsie. Genomová DNA může být použita přímo pro detekci nebo může být před analýzou enzymaticky amplifikována pomocí PCR (Saiki a d., Nature, 324:163-166 (1986)). Pro stejný účel může být rovněž použita RNA nebo cDNA. Jako příklad mohou být primery PCR komplementární k nukleové kyselině, kódující FGF-10, použity k identifikaci a analýze mutací FGF-10. Delece a inserce mohou být například detekovány na základě změny velikosti amplifikovaného produktu oproti normálnímu genotypu. Bodové mutace mohou být identifikovány hybridizací amplifikované DNA s RNA radioznačeného FGF-10 nebo alternativně s antimediatorovými sekvencemi DNA radioznačeného FGF-10. Dokonale souhlasící sekvence mohou být od chybných duplexů odlišeny digescí s RNasou A nebo na základě rozdílu teplot tání.

Genetické testování na základě rozdílů sekvencí DNA může být prováděno detekcí nebo změnou elektroforetické mobility fragmentů DNA v gelech s denaturačními činidly nebo bez nich. Malé delece a inserce v sekvencích mohou být vizualizovány pomocí gelové elektroforézy vysokého rozlišení. Fragmenty DNA s různými sekvencemi mohou být rozlišeny na gelech s gradientem denaturujícího formamidu, na nichž je mobilita různých fragmentů DNA v gelu zpomalena v různých polohách podle jejich konkrétní teploty tání nebo částečného tání (viz například Myers a d., Science, 230:1242 (1985)).

Změny sekvence v konkrétních místech je možno rovněž odhalit pomocí testů nukleasové ochrany, například ochrany RNasy a S1, nebo metodou chemického štěpení (například Cotton a d., PNAS, USA, 85:4397-4401 (1985)).

Detekci konkrétní sekvence DNA je tedy možno provádět metodami, jako je hybridizace, ochrana RNasy, chemické štěpení, přímé sekvenování DNA nebo použití restričních enzymů (například metoda polymorfismů délek restričních fragmentů, FRLP) a Southernův blotting genomové DNA.

Kromě běžnějších metod gelové elektroforézy a sekvenování DNA je možno mutace také detekovat analýzou *in situ*.

Vynález se rovněž týká diagnostického testu pro detekci pozměněných hladin proteinu FGF-10 v různých tkáních, poněvadž hyperexprese proteinů v porovnání s normálními kontrolními tkáňovými vzorky může detekovat přítomnost onemocnění nebo náchylnosti k onemocnění, například k nádoru. Testy, používané k detekci hladiny proteinu FGF-10 ve vzorku získaném od hostitele jsou odborníkům známy a zahrnují radioimunoanalýzu, testy kompetitivní vazby, analýzou westernovým přenosem, testy ELISA a „sendvičové“ testy. Test ELISA (Coligan a d., Current Protocols in Immunology, 1(2), kapitola 6, (1991)) zahrnuje nejprve přípravu protilátky specifické vůči antigenu FGF-10, přednostně monoklonální protilátky. Dále se připraví reporterová protilátka k monoklonální protilátce. K reporterové protilátce se naváže detekovatelné činidlo, například radioaktivní, fluorescenční nebo v tomto příkladu enzym křenová peroxidasa. Z hostitele se odebere vzorek a inkubuje se na pevném nosiči, například na polystyrenové misce, která váže proteiny ve vzorku. Veškerá volná vazebná místa proteinů na misce se pak pokryjí inkubací s nespecifickým proteinem, jako je bovinní sérový albumin. Pak se v misce inkubuje monoklonální protilátka, během kteréžto doby se monoklonální protilátky navážou na všechny proteiny FGF-10, navázané na polystyrenovou misku. Zbylá nenavázaná monoklonální protilátka se odstraní promytím pufrem. Do misky se nyní vloží reporterová protilátka, navázaná na křenovou peroxidasu, což vede k navázání reporterové protilátky na veškerou monoklonální protilátku navázanou na FGF-10. Nenavázaná reporterová protilátka se odstraní promytím. Pak se k misce přidají peroxidasové substráty a množství zbarvení, vyvinuté za danou dobu, je při porovnání se standardní křivkou mírou množství proteinu FGF-10, přítomného v daném objemu pacientova vzorku.

Je možno použít kompetitivní test, při němž se protilátky specifické k FGF-10 navážou na pevný nosič a přes pevný nosič se vede značený FGF-10 a vzorek získaný od hostitele a detekované množství značky, například kapalnou scintilační chromatografií, může být korelováno s množstvím FGF-10 ve vzorku.

Testu ELISA je podobný „sendvičový“ test. V „sendvičovém“ testu se FGF-10 vede přes pevný nosič a váže se na protilátku navázanou na pevný nosič. Na FGF-10 se pak naváže druhá protilátka. Pak se přes pevný nosič vede třetí protilátka, která je značená a je specifická k druhé protilátce a která se váže na druhou protilátku, a pak je možno kvantifikovat množství.

Sekvence podle vynálezu jsou cenné rovněž pro identifikaci chromosomů. Sekvence je specificky cílena na konkrétní polohu na jednotlivém lidském chromosomu a může s ní hybridizovat. Navíc existuje v současnosti potřeba identifikace konkrétních míst na chromosomu. Pro označení polohy na chromosomu je v současnosti k dispozici málo činidel založených na skutečných sekvenčních datech (polymorfismy repetice). Mapování DNA do chromosomů podle vynálezu je důležitým prvním stupněm v korelaci těchto sekvencí s geny spojenými s určitým onemocněním.

Stručně řečeno mohou být sekvence mapovány do chromosomů tak, že se z cDNA připraví primery PCR (přednostně 15 až 25 bp). Použije se komputerová analýza 3'-nepřeložené oblasti k rychlému výběru primerů, které nepřesahují více než jeden exon v genomové DNA, a tak komplikují proces amplifikace. Tyto primery se pak použijí pro PCR screening hybridů somatických buněk obsahujících jednotlivé lidské chromosomy. Pouze hybridy, obsahující lidský gen odpovídající primeru, poskytnou amplifikovaný fragment.

PCR mapování hybridů somatických buněk je rychlý postup pro přiřazení konkrétní DNA ke konkrétnímu chromosomu.

S použitím vynálezu pro stejné oligonukleotidové primery je možno analogickým způsobem provést sublokalizaci s panely fragmentů ze specifických chromosomů nebo soubory velkých genomických klonů. Další strategie, které je možno použít podobně k mapování do chromosomu, zahrnují hybridizaci *in situ*, prescreening se značenými průtokově tříděnými chromosomy a hybridizační preselekci pro konstrukci knihoven chromosomově specifických cDNA.

K získání přesné polohy na chromosomu v jednom stupni je možno použít fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) klonu cDNA s metafázovým rozšířením chromosomu. Tuto metodu lze použít již při délce cDNA pouze 500 nebo 600 bází; klony větší než 2000 bp však mají vyšší pravděpodobnost vazby k jediné chromosomální poloze s dostatečnou intenzitou signálu pro jednoduchou detekci. FISH vyžaduje použití klonů, od nichž byl odvozen úsek expresní sekvence (fragment genu podle vynálezu), a čím delších, tím lépe. K získání dobrých výsledků v rozumné době například stačí 2000 bp, 4000 bp je lepších a více než 4000 bp pravděpodobně není nutných. Popis této metody je možno najít v Verma a d., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

Jakmile se sekvence přiřadí přesné poloze na chromosomu, je možno fyzickou polohu sekvence na chromosomu korelovat s údaji genetické mapy. (Takové údaje jsou uvedeny například v V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (dostupné in line prostřednictvím John Hopkins University Welch Medical Library)). Vztah mezi geny a onemocněními, které byly mapovány do téže chromosomální oblasti, se pak identifikuje vazebnou analýzou (spoludědění fyzicky sousedících genů).

Dále je nutno stanovit rozdíly cDNA nebo genomické sekvence mezi postiženými a nepostiženými jedinci. Je-li u některých nebo všech postižených jedinců pozorována mutace, která však není pozorována u žádného normálního jedince, pak je mutace pravděpodobně původcem onemocnění.

Při současném rozlišení metod fyzikálního a genetického mapování může být cDNA, přesně lokalizovaná do oblasti chromosomu, spojené s onemocněním, jedním z 50 až 500 potenciálních vyvolávajících genů. (Z toho vyplývá mapovací rozlišení 1 megabáze a jeden gen na 20 kb.)

Polypeptidy, jejich fragmenty nebo jiné deriváty nebo jejich analogy nebo buňky je exprimující mohou být použity jako imunogen k vyvolání tvorby protilátek. Tyto protilátky mohou být například polyklonální nebo monoklonální. Vynález zahrnuje také chimerické, jednořetězcové a humanizované protilátky, stejně jako fragmenty Fab nebo produkt expresní knihovny Fab. Pro získání těchto protilátek a fragmentů je možno použít různé známé postupy.

Protilátky vytvořené proti polypeptidům, odpovídajícím sekvenci podle vynálezu, mohou být získány přímou injekční aplikací polypeptidů živočichovi nebo podáním polypeptidů živočichovi, přednostně jinému než člověku. Takto získaná protilátka pak sama váže tyto polypeptidy. Tímto způsobem je možno použít i sekvence, kódující pouze fragment polypeptidů, k vytvoření protilátek, vázajících celé nativní polypeptidy. Tyto protilátky pak mohou být použity k izolaci polypeptidu z tkáně, která jej exprimuje.

Pro přípravu monoklonálních protilátek je možno použít jakoukoli metodu, která poskytuje protilátky produkované kontinuálními kulturami buněčných linií. Příklady technik pro získání monoklonálních protilátek zahrnují metodu hybridomů (Kohler a Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), metodu triomů, metodu hybridomů lidských B-buněk (Kozbor a d., 1983, Immunology Today 4:72) a metodu EBV-hybridomů pro získání lidských monoklonálních protilátek (Cole a d., 1985, v Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., str. 77-96).

Metody popsané pro produkci jednořetězcových protilátek (patent US 4,946.778) mohou být upraveny pro získání

jednořetězcových protilátek k imunogenním polypeptidickým produktům podle vynálezu. K expresi humanizovaných protilátek k imunogenním polypeptidickým produktům podle vynálezu mohou být rovněž použity transgenní myši.

Přehled obrázků na výkresech

Vynález je blíže popsán v souvislosti s připojenými výkresy, které představují konkrétní provedení vynálezu, avšak neomezují jeho rozsah.

Obr. 1 zobrazuje sekvenci cDNA a odpovídající odvozenou sekvenci aminokyselin FGF-10. Znázorněná sekvence aminokyselin reprezentuje maturovanou formu proteinu. Jsou použity standardní jednopísmenové zkratky aminokyselin. Sekvenční nepřesnosti jsou společným problémem při stanovování polynukleotidových sekvencí. Sekvenování bylo provedeno pomocí automatického sekvenátoru DNA 373 (Applied Biosystems, Inc.). Sekvenční přesnost se předpokládá vyšší než 97 %.

Obr. 2 znázorňuje homologii sekvencí aminokyselin mezi FGF-10 a ostatními členy skupiny FGF. Konzervativní aminokyseliny jsou vyznačeny tučně.

Obr. 3 znázorňuje gel SDS-PAGE po transkripci/translaci proteinu FGF-10.

Příklady provedení vynálezu

Vynález je osvětlen na příkladech provedení, které jej však nijak neomezují. Všechny díly a množství, není-li uvedeno jinak, jsou myšleny hmotnostně.

Pro usnadnění pochopení příkladů se uvádějí některé často se vyskytující metody a/nebo výrazy.

„Plasmidy“ se označují malým písmenem p, před nímž a/nebo za nímž jsou uvedena velká písmena a/nebo číslice. Zde použité výchozí plasmidy jsou buď komerčně dostupné, veřejně neomezeně přístupné nebo mohou být konstruovány z dostupných plasmidů publikovanými postupy. Kromě toho jsou v oboru známy a odborníkům jsou zřejmé ekvivalentní plasmidy.

„Digesce“ DNA označuje katalytické štěpení DNA restriktivním enzymem, který působí pouze v některých sekvencích v DNA. Různé zde použité restriktivní enzymy jsou komerčně dostupné a byly použity reakční podmínky, kofaktory a další požadavky, které jsou běžnému odborníkovi známe. Pro analytické účely se typicky použije 1 µg plasmidu nebo fragmentu DNA s asi 2 jednotkami enzymu v asi 20 µl tlumivého roztoku. Za účelem izolace fragmentů DNA pro konstrukci plasmidu se typicky digeruje 5 až 50 µg DNA s 20 až 250 jednotkami enzymu ve větším objemu. Vhodné pufrы a množství substrátu pro konkrétní restriktivní enzymy uvádí výrobce. Obvykle se používá doba inkubace asi 1 h při 37 °C, ale podle pokynů dodavatele se může měnit. Po digesci se reakční směs přímo podrobí elektroforéze na polyakrylamidovém gelu za účelem izolace požadovaného fragmentu.

Dělení odštěpených fragmentů podle velikosti se provádí s použitím 8 % polyakrylamidového gelu, popsaného v Goeddel, D., a d., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980).

Výraz „oligonukleotidy“ se vztahuje buď na jednořetězcový polydeoxynukleotid nebo na dva komplementární polydeoxynukleotidové řetězce, které mohou být syntetizovány chemicky. Tyto syntetické oligonukleotidy nemají 5'-fosfát, a tudíž se nevážou k jinému oligonukleotidu bez přídavku fosfátu s ATP v přítomnosti kinasy. Syntetický oligonukleotid se váže k fragmentu, který nebyl defosforylován.

„Ligace“ označuje proces vytváření fosfodiesterových vazeb mezi dvěma dvouvláknovými fragmenty nukleové kyseliny (Maniatis, T., a d., tamtéž, str. 146). Není-li uvedeno

jinak, je možno ligaci uskutečnit s použitím známých pufrů a známých podmínek s 10 jednotkami ligasy T4 DNA („ligasa“) na 0,5 μ g přibližně ekvimolárních množství spojovaných fragmentů DNA.

Není-li uvedeno jinak, byla transformace prováděna způsobem popsáným v Graham, F., a Van der Eb, A., Virology, 52:456-457 (1973).

Příklad 1

Tkáňová distribuce mRNA FGF-10 v dospělých lidských tkáních

Pro analýzu exprese mRNA FGF-10 byla provedena northernová analýza s 2 μ g poly A⁺ mRNA z různých dospělých lidských tkání s použitím radioaktivně značené celé cDNA FGF-10 jako sondy. Výsledky ukazují, že 1,4 kb informace je exprimována nejhojněji v kosterním svalu, na střední úrovni v srdci, mozku, placentě, ledvině a pankreatu a na nižší úrovni v játrech. V srdci jsou přítomny 3 další fragmenty o velikosti 4,4 kb, 2,4 kb a 0,5 kb. Je pravděpodobné, že tyto různé velikosti mRNA v srdci jsou výsledkem alternativního sestřihu. V mozku je také přítomna 4,4 kb mRNA. Nylonový blot s 2 μ g poly A⁺ mRNA z několika dospělých lidských tkání, navázaný na membránu, byl získán od Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA. Tento blot byl hybridizován s celou cDNA FGF-10, značenou náhodně iniciovaným značením radioaktivním dCTP. Hybridizace byla prováděna přes noc při 65 °C v 7 % SDS, 0,5 M NaPO₄, pH 7,2 a 1 % BSA. Po 2x 30 min promytí v 0,2 x SSC, 0,1 % SDS při 65 °C byl blot přes noc vystaven rentgenovému filmu s intensifikační clonou.

Příklad 2

Expres FGF-10 transkripce a translace *in vitro*

cDNA FGF-10, ATCC # 75696, byla podrobena transkripci a translaci *in vitro* za účelem stanovení velikosti přepsatelného polypeptidu kódovaného úplnou a částečnou cDNA FGF-10. Úplné a částečné inserty cDNA FGF-10 ve vektoru pBluescript SK byly amplifikovány pomocí PCR se třemi dvojicemi primerů: 1) zpětný a přímý primer M13, 2) zpětný primer M13 a FGF primer P20, 3) zpětný primer M13 a FGF primer P22. Sekvence těchto primerů jsou následující:

Zpětný primer M13-2:

5'-ATGCTTCCGGCTCGTATG-3' (SEQ ID NO 3)

Tato sekvence je umístěna před 5'-koncem insertu cDNA FGF-10 ve vektoru pBluescript a má orientaci proti směru cDNA. Mezi tímto primerem a cDNA FGF-10 je umístěna sekvence promotoru T3.

Přímý primer M13-2:

5'-GGGTTTTCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO 4)

Tato sekvence je umístěna za 3'-koncem insertu cDNA FGF-10 ve vektoru pBluescript a má orientaci proti směru insertu cDNA.

FGF primer P20:

5'-GTGAGATCTGAGGGAAGAAGGGGA-3' (SEQ ID NO 5)

Sekvence 15 bp tohoto primeru na 3'-konci je proti směru sekvence cDNA FGF-10 bp 780 až 766, která je umístěna 12 bp za stop kodonem.

FGF primer P22:

5'-CCACCGATAATCCTCCTT-3' (SEQ ID NO 6)

Tato sekvence je umístěna v cDNA FGF-10 v protisměrné orientaci a je asi 213 bp za stop kodonem.

Reakce PCR se všemi třemi dvojicemi primerů produkuje amplifikované produkty se sekvencí promotoru T3 před insertem cDNA. Všechny tři dvojice primerů produkuje produkty PCR, které kódují plnou délku polypeptidu FGF-10.

Pro transkripci/translaci *in vitro* bylo použito přibližně 1 µg produktu PCR z první dvojice primerů, 0,3 µg z druhé dvojice primerů a 0,3 µg ze třetí dvojice primerů. Transkripční/translační reakce *in vitro* byla prováděna v objemu 25 µl s použitím systému spojeného retikulocytového lyzátu T_NTTM (Promega, č. kat. L4950). Konkrétně reakční směs obsahuje 12,5 µl lyzátu králičích retikulocytů T_NT, 2 µl reakčního pufru T_NT, 1 µl polymerasy T3, 1 µl 1 mM směsi aminokyselin (minus methionin), 4 µl ³⁵S-methioninu (> 1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 1 µl 40 U/µl inhibitoru ribonukleasy RNasin a 0,5 nebo 1 µg produktů PCR. Objem byl doplněn H₂O bez obsahu nukleasy na 25 µl. Reakční směs byla inkubována 2 h při 30 °C. 5 µl reakčního produktu bylo analyzováno na gradientu 4-20 % gelu SDS-PAGE. Po fixaci v 25% isopropanolu a 10% kyselině octové byl gel vysušen a vystaven přes noc při 70 °C rentgenovému filmu.

Jak je znázorněno na obr. 3, produkty PCR obsahující plnou délku cDNA FGF-10 a cDNA s chybějícími přibližně 340 bp a přibližně 140 bp ve 3'-nepřepsané oblasti (3'-UTR) produkovaly tutéž délku přepsaných produktů, jejichž molekulová hmotnost se odhaduje na asi 19 kD (pruhy 2 až 4).

Na základě výše uvedených údajů je možno vynález různě modifikovat a obměňovat, a proto je možno jej v rozsahu připojených nároků uskutečňovat jinak než bylo konkrétně popsáno.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) VŠEOBECNÉ INFORMACE

(i) PŘIHLAŠOVATEL: HU A D.

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: FIBROBLASTOVÝ RŮSTOVÝ FAKTOR-10

(iii) POČET SEKVENCÍ: 6

(iv) KORESPONDENČNÍ ADRESA:

(A) ADRESÁT: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN,
CECCHI, STEWART & OLSTEIN

(B) ULICE: 6 BECKER FARM ROAD

(C) MĚSTO: ROSELAND

(D) STÁT: NEW JERSEY

(E) ZEMĚ: USA

(F) POŠT. KÓD: 07068

(v) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:

(A) TYP MÉDIA: DISKETA 3,5 "

(B) POČÍTAČ: IBM PS/2

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: MS-DOS

(D) SOFTWARE: WORD PERFECT 5.1

(vi) ÚDAJE O SOUČASNÉ PŘIHLÁŠCE:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:

(B) DATUM PODÁNÍ: SOUČASNĚ

(C) KLASIFIKACE:

(vii) ÚDAJE O DŘÍVĚJŠÍ PŘIHLÁŠCE:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: 08/207,412

(B) DATUM PODÁNÍ: 8. BŘEZEN 1994

(viii) INFORMACE O ZÁSTUPCI/AGENTOVI:

(A) JMÉNO: FERRARO, GREGORY D.

(B) REGISTRAČNÍ ČÍSLO: 36,134

(C) ZNAČKA/ČÍSLO SPISU: 325800-347

(ix) TELEKOMUNIKAČNÍ INFORMACE:

(A) TELEFON: 201-994-1700

(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1121 PÁRŮ BÁZÍ
 (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
 (C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ
 (D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 1:

```

GGCAAAGTGG GATGATCTGT CACTACACCT GCAGCACCAC GCTCGGAGGA CAGCTCCTGC 60
CTGCAGCTTC CAGACCCAGG AAGCCTGAGG GGAAGGAAGG AAGTACGGGC GAAATCATCA 120
GATTGGCTTC CCAGATTGAG GAATCTGAAG CGGGCCCACA TCTTCCGGCC AACTTCCATT 180
GAACTTCCCA GCACTCGAAA GGGACCGAAA TGGAGAGCAA AGAACCCAG CTCAAAGGGA 240
TTGTGACAAG GTTATTCAGC CAGCAGGGAT ACTTCCTGCA GATGCACCCA GATGGTACCA 300
TTGATGGGAC CAAGGACGAA AACAGCGACT ACACTCTCTT CAATCTAATT CCGTGGGCC 360
TGCGTGTAGT GGCCATCCAA GGAGTGAAGG CTAGCCTCTA TGTGGCCATG AATGGTGAAG 420
GCTATCTCTA CAGTTCAGAT GTTTTCACTC CAGAATGCAA ATTCAAGGAA TCTGTGTTTG 480
AAACTACTA TGTGATCTAT TCTTCCACAC TGTACCGCCA GCAAGAATCA GGCCGAGCTT 540
GGTTTCTGGG ACTCAATAAA GAAGGTCAAA TTATGAAGGG GAACAGAGTG AAGAAAACCA 600
AGCCCTCATC ACATTTTGTA CCGAAACCTA TTGAAGTGTG TATGTACAGA GAACCATCGC 660
TACATGAAAT TGGAGAAAAA CAAGGGCGTT CAAGGAAAAG TTCTGGAACA CCAACCATGA 720
ATGGAGGCAA AGTTGTGAAT CAAGATTCAA CATAGCTGAG AACTCTCCCC TTCTTCCCTC 780
TCTCATCCCT TCCCCTTCCC TTCCTTCCCA TTTACCCATT TCCTTCCAGT AAATCCACCC 840
AAGGAGAGGA AAATAAAATG ACAACGCAAG CACCTAGTGG CTAAGATTCT GCACTCAAAA 900
TCTTCCTTTG TGTAGGACAA GAAAATTGAA CCAAAGCTTG CTTGTTGCAA TGTGTAGAA 960
AATTCACGTT CACAAAGATT ATCACACTTA AAAGCAAAGG AAAAAATAAA TCAGAACTCC 1020
ATAAATATTA AACTAAACTG TATTGTTATT AGTAGAAGGC TAATTGTAAT GAAGACATTA 1080
ATAAAGGTGA AATAAACTTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1121

```

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 181 AMINOKYSELIN

(B) TYP: AMINOKYSELINA

(C) VLÁKNO:

(D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: PROTEIN

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 2:

Met	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gln	Leu	Lys	Gly	Ile	Val	Thr	Arg	Leu	5	10	15
Phe	Ser	Gln	Gln	Gly	Tyr	Phe	Leu	Gln	Met	His	Pro	Asp	Gly	Thr	20	25	30
Ile	Asp	Gly	Thr	Lys	Asp	Glu	Asn	Ser	Asp	Tyr	Thr	Leu	Phe	Asn	35	40	45
Leu	Ile	Pro	Val	Gly	Leu	Arg	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Gly	Val	Lys	50	55	60
Ala	Ser	Leu	Tyr	Val	Ala	Met	Asn	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ser	65	70	75
Ser	Asp	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Cys	Lys	Phe	Lys	Glu	Ser	Val	Phe	80	85	90
Glu	Asn	Tyr	Tyr	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gln	95	100	105
Glu	Ser	Gly	Arg	Ala	Trp	Phe	Leu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Gly	Gln	110	115	120
Ile	Met	Lys	Gly	Asn	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Ser	Ser	His	125	130	135
Phe	Val	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Val	Cys	Met	Tyr	Arg	Glu	Pro	Ser	140	145	150
Leu	His	Glu	Ile	Gly	Glu	Lys	Gln	Gly	Arg	Ser	Arg	Lys	Ser	Ser	155	160	165
Gly	Thr	Pro	Thr	Met	Asn	Gly	Gly	Lys	Val	Val	Asn	Gln	Asp	Ser	170	175	180

Thr

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 PÁRŮ BÁZÍ
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ
- (D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 3:

ATGCTTCCGG CTCGTATG

18

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 PÁRŮ BÁZÍ
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ
- (D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 4:

GGGTTTTCCC AGTCACGAC

19

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 PÁRŮ BÁZÍ
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ
- (D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 5:

GTGAGATCTG AGGGAAGAAG GGGA

24

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 PÁŘŮ BÁZÍ
- (B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA
- (C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ
- (D) TOPOLOGIE: LINEÁRNÍ

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO 6:

CCACCGATAA TCCTCCTT

18

P A T E N T O V É N Á R O K

č.j.	64597
DOSLO	05 IX 96
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

1. Izolovaný polynukleotid, vybraný ze skupiny tvořené
 - a) polynukleotidem kódujícím polypeptid s odvozenou sekvencí aminokyselin SEQ ID NO 2 nebo fragment, analog nebo derivát tohoto polypeptidu,
 - b) polynukleotidem kódujícím polypeptid se sekvencí aminokyselin kódovanou cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696, nebo fragment, analog nebo derivát tohoto polypeptidu.
2. Polynukleotid podle nároku 1, kterým je DNA.
3. Polynukleotid podle nároku 1, kterým je RNA.
4. Polynukleotid podle nároku 1, kterým je genomová DNA.
5. Polynukleotid podle nároku 2, který kóduje polypeptid s odvozenou sekvencí aminokyselin SEQ ID NO 2.
6. Polynukleotid podle nároku 2, který kóduje polypeptid kódovaný cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696.
7. Polynukleotid podle nároku 1, mající kódující sekvenci uvedenou jako SEQ ID NO 1.
8. Polynukleotid podle nároku 2, mající kódující sekvenci polypeptidu, uloženou v ATCC pod č. 75696.

9. Vektor, obsahující DNA podle nároku 2.

10. Hostitelská buňka, geneticky manipulovaná vektorem podle nároku 9.

11. Způsob výroby polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že z hostitelské buňky podle nároku 10 exprimuje polypeptid kódovaný uvedenou DNA.

12. Způsob výroby buněk schopných exprimovat polypeptid, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se buňky geneticky manipulují vektorem podle nároku 9.

13. Izolovaná DNA, hybridizovatelná s DNA podle nároku 2 a kódující polypeptid mající aktivitu FGF-10.

14. Polypeptid, zvolený ze skupiny tvořené (i) polypeptidem s odvozenou sekvencí aminokyselin SEQ ID NO 2 a jeho fragmenty, analogy nebo deriváty a (ii) polypeptidem kódovaným cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696, a fragmenty, analogy nebo deriváty tohoto polypeptidu.

15. Polypeptid podle nároku 14, kterým je FGF-10 s odvozenou sekvencí aminokyselin SEQ ID NO 2.

16. Protilátka proti polypeptidu podle nároku 14.

17. Sloučenina, účinná jako agonista k polypeptidu podle nároku 14.

č.j.	0 1 1 2 0 2
00Š10	1 1 1 1 1 1
11. 11. 97	1 1 1 1 1 1
UŘAD PRŮMYSLU VLASTNICTVÍ	antagonista
PŘÍL.	jako

18. Sloučenina, účinná polypeptidu podle nároku 14.

19. Použití polypeptidu podle nároku 14 k výrobě léčiva pro léčbu nebo prevenci onemocnění nebo fyzických poruch zmírňovaných působením FGF-10.

20. Použití sloučeniny podle nároku 18 k výrobě léčiva pro léčbu nebo prevenci onemocnění nebo fyzických poruch vznikajících působením FGF-10.

21. Způsob identifikace sloučenin účinných jako agonisté a antagonisté FGF-10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

(a) se za podmínek, kdy jsou buňky normálně stimulovány FGF-10, uvede do styku FGF-10, sloučenina podrobovaná screeningu a reakční směs obsahující buňky, přičemž uvedená reakční směs obsahuje značku, zabudovávanou do buněk při jejich proliferaci, a

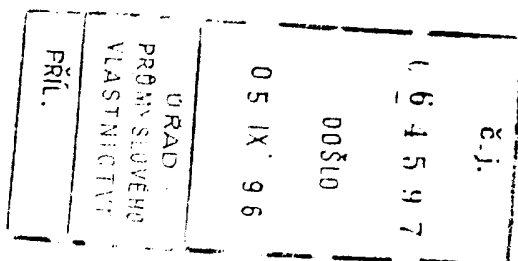
(b) stanoví se rozsah proliferace buněk za účelem identifikace, zda je sloučenina účinným agonistou nebo antagonistou.

22. Způsob diagnostiky onemocnění nebo náchylnosti k onemocnění souvisejícího se sníženou expresí polypeptidu podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se stanoví mutace v sekvenci nukleové kyseliny kódující tento polypeptid, přičemž se tento způsob provádí *in vitro*.

Obr. I A

1
GGCAAAGTGGGATGATCTGTCTACTACCTGCAGCACCCAGCTCGGAGGACAGCTCCTGC
60
CTGCAGCTTCCAGACCCAGGAAGCCTGAGGGAAGGAAGTACGGCGAAATCATCA
61
GATTGGCTTCCAGATTTGGGAATCTGAAGCGGGCCACATCTTCCGGCCAACTTCCATT
121
GAACTTCCAGCACTCGAAAGGACCGAAATGGAGAGCAAGAACCAGCTCAAAGGGA
181
TTGTGACAAAGGTTATTAGCCAGCAGGATACTTCTGCAGATGCACCCAGATGGTACCA
241
V T R L F S Q Q G Y F L Q M H P D G T I 31
TTGATGGACCAAGGACGAAACAGCGACTACTCTCTTCAATCTAATTCCCGTGGCC
301
D G T K D E N S D Y T L F N L I P V G L 51
TCCGTGTAGTGGCCATCCAAGGAGTGAAGGCTAGCCCTCTATGTGGCCATGAATGTTAAG
361
R V V A I Q G V K A S L Y V A M N G E G 71

navazuje na obr. 1 B



navazuje na obr. 1 A

Obr. 1 B

421 GCTATCTCTACAGTTCAGATGTTTCTCACTCCAGAATGCAAAATCAAGGAATCTGTGTTTG
Y L Y S S D V F T P E C K F K E S V F E 480
481 AAACTACTATGTGATCTATTCTTCCACACTGTACCGCCAGCAAGAATCAGGCCGAGCTT
N Y Y V I Y S S T L Y R Q Q E S G R A W 540
541 GGTTCCTGGGACTCAATAAGAAGGTCAAAATTATGAAGGGGAACAGAGTGAAGAAACCA
F L G L N K E G Q I M K G N R V K K T K 600
601 AGCCCTCATCATTTGTACCGAAACCTATTGAAGTGTGTATGTACAGAGAACCATCGC
P S S H F V P K P I E V C M Y R E P S L 660
661 TACATGAAATTGGAGAAAACAAGGGCGTTCAAGGAAAAGTTCTGGAACACCAACCATGA
H E I G E K Q G R S R K S S G T P T M N 720
721 ATGAGGCAAAGTTGTGAATCAAGATTCAACATAGCTGAGAACTCTCCCTTCTTCCCTC
G G K V V N Q D S T * 780
181

navazuje na obr. 1 C

PRIL.	URAD	96 XI 50	765190	2
PROSTOR ZA VLAŠTINICTVO	PROSTOR ZA SLOVENSKO VLAŠTINICTVO	01500		

Obr. 1 C

```

781 TCTCATCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCAATTACCCATTTCCTTCCAGTAAATCCACCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

841 AAGGAGAGGAAATAAATGACAACGCAACCTAGTGGCTAAGATTCTGCACTCAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

901 TCTTCCCTTGTGTAGGACAAGAAATTGAAACCAAGCTTGCTTGTGCAATGTTGTAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

961 AATCAGGTTCAACAAGATTATCACACTTAAAGCAAGGAAATAAATCAGAACTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

1021 ATAAATATTAACCTAACTGTATTGTATTATTAGTAGAGGCTAATTGTAATGAAGACATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

1081 ATAAAGGTGAAATAAACTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1121

```

PRIL.	URAD PROSTORSKEHO VLAŠTNIŠTVA	96 XI 50	01300	664597	8.1.
-------	-------------------------------------	----------	-------	--------	------

Obr. 2 A

7

Egf-1
Egf-2
Egf-4
Egf-6
Egf-5
Egf-9
Egf10
Egf-3
Egf-7

[illegible]

51

Fgf-1
Fgf-2
Fgf-4
Fgf-6
Fgf-5
Fgf-9
Fgf10
Fgf-3
Fgf-7

GRGRGRGTAA PRAAPAARGSMAE GEITTTALT EKFN...LPP 100
APTAPNGTLE AELERRWESL RPPAGTMAA GSITTLPALP EDGSGAFPP
TR.ANNTLLD S...RGWGT LSLARLPV VALSLARLPV AA..QPKEA VQSGAGDYLL
PAATDRNPIG SSSRQSSSA MSSSSASSP AASLGSQSG VNWESG.YLV
NYFGVQDAVP FGNVPLPVD SPVLLSDHLG LEQSSSQWSP
..... MGLIWLLLLS LLEPGWPAAG QSEAGGLPRG PAVTDLDHLK
..... ICLVGTISLA CNDMTPEQMA TNNVNCSSPER HTRSVDYMEG
..... TLLYRSCFHI

101

Egf-1
Egf-2
Egf-4
Egf-6
Egf-5

150	GNYKKPKLLY	CSNGGHFLRI	LPDGTVDGTR	DRSDQHIQLQ	LSAESVGEVY
	GHFKDPKRLY	CKNGGFFLRI	HPDGRVDGVR	EKSDPHIKLQ	LQAEERGVVS
	GIKRLRRLYC	NVGIGFHLQA	LPDGRIGGAH	ADT.RDSLLE	LSPVERGVVS
	GIKRQRRLYC	NVGIGFHLQV	LPDGRISGTH	EEN.PYSLLE	ISTVERGVVS
	SGRRRTGSLYC	RVGIGFHLQI	YPDGKVNESH	EAN.MLSVLE	IFAVSQGIVG

navazuje na obr. 2 B

4 / 7

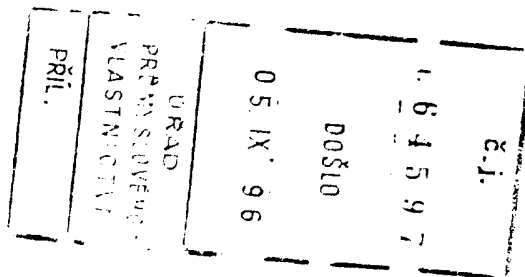
č.j. 6 64597
DOŠLO
05. IX. 96
URAD
PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

Obr. 2 B

Fgf-9 GILRRRQLYC RT..GFHLEI FPNGTIQGTR KDHSRFGILE FISIAGLVLS
 Fgf10 GIVTR..LFS QQ..GYFLQM HPDGTIDGTK DENSDYTLFN LIPVGLRVVA
 Fgf-3 GAPRRRKLYC AT..KYHLQL HPSSGRVNGSL .ENSAYSILE ITAVEVGIVA
 Fgf-7 GDIRVRRLFC RT..QWYLRI DKGKVKGTQ EMKNNNYNIME IRTVAVGIVA

151
 IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLE LERLEENHYN TYISKKH... 200
 IKGVCANRYL AMKEDGRLLA SKCVTDECFF FERLESNNYN TYRSRKY...
 IFGVASREFV AMSSKGKLYG SPFFTDECTF KEILLPNNYN AYESYKY...
 LFGVRSALFV AMNSKGRLYA TPSFQEECKF RETLLPNNYN AYESDLY...
 IRGVFSNKFL AMSKKGKLLHA SAKFTDDCKF RERFQENSYN TYASAIH...
 IRGVDGGLYL GMNEKGELYG SEKLTQECVF REQFEENWYN TYSSNLY...
 IQGVKASLYV AMNGEGYLYS SDVFTPECKF KESVFENYV TYSSSTLY...
 IRGLFSGRYL AMNKRGRLYA SEHYSACECF VERIHGELYN TYASRLYRTV
 IKGVESEFYL AMNKEGKLYA KKECNEDCNF KELILENHYN TYASAKW...

201
 AEKNWFVGL KKNCSCKRG. 250
 T..SWYVAL KRTGQYKLG. ILFLPLPVSS
 PGMFIAL SKNGKTKKG. ILFLPMSAKS
 QGTYIAL SKYGRVKRG. THFLPRL...
 RTE KTGREWYVAL NKRGAKRGC THFLPRI...
 KHV DTGRRYYVAL NKDGTTPREG. THFLPRFKQS
 RQQ ESGRAWFLGL NKEGQIMKG. THFLPRPVD.
 SSTPGARRQP SAERLWYVSV NGKGRPRRG. THFLPRKPIE.
 T HNGGEMFVAL NOKGIPVRG. THFLPRVLDH
 KKTKEQKT AHFLPMAIT.



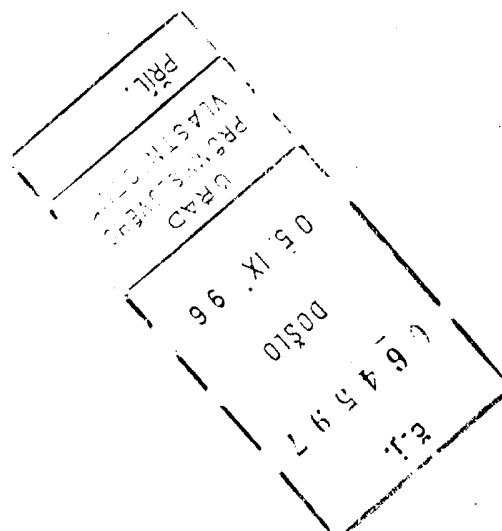
navazuje na obr. 2 B

251

[illegible]

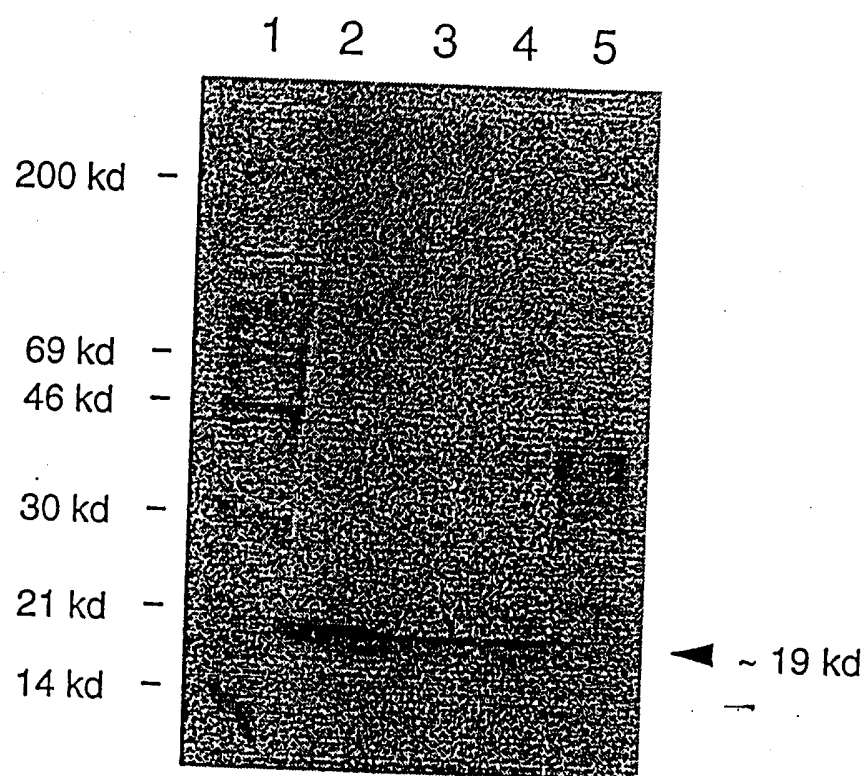
301

Fgf-1	...
Fgf-2	...
Fgf-4	...
Fgf-6	...
Fgf-5	...
Fgf-9	...
Fgf10	T*
Fgf-3	ASAH
Fgf-7	...



7 / 7

Obr. 3



Pruh 1: ^{14}C + marker rainbow M.W.

Pruh 2: FGF-10 (zpětný + přímý primer M13)

Pruh 3: FGF-10 (zpětný primer M13 + primer FGF-P20)

Pruh 4: FGF-10 (zpětný primer M13 + primer FGF-P22)

Pruh 5: kontrola FGF