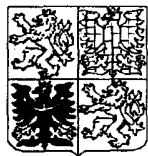


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 715

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 1942

(22) Přihlášeno: 12.02.1993

(30) Právo přednosti:

12.02.1992 EP 1992/92102324

(40) Zveřejněno: 18.10.1995

(Věstník č. 10/1995)

(47) Uděleno: 21.11.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.01.2001

(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: PCT/EP93/00350

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/16099

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 15/18

C 07 K 14/495

A 61 K 38/18

A 61 P 43/00

(73) Majitel patentu:

BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG
VON PHARMAKA MBH, Heidelberg, DE;

(72) Původce vynálezu:

Neidhardt Helge dr., Marburg, DE;
Hötten Gertrud, Bammental, DE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

Sekvence DNA, rekombinantní molekula DNA s jejím obsahem, způsob výroby proteinu ze skupiny látek TGF-beta, farmaceutický prostředek s jeho obsahem, protilátka nebo její fragment a její použití

(57) Anotace:

Sekvence DNA kódující protein ze skupiny látek TGF- β , zvolené ze souboru sestávajícího z a) sekvence DNA, obsahující nukleotidy ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA se čtecím rámcem pro protein, začínajícím na prvním nukleotidu, b) sekvence DNA, která je degenerovaná, c) sekvence DNA, která kóduje protein, který se odlišuje od proteinu, jenž je kódován DNA sekvencí z a) pouze konzervativními aminokyselinovými výměnami, a d) sekvence DNA, která hybridizuje k sekvenci DNA uvedené v a) nebo b) a kóduje protein, který obsahuje sekvenci Met-Asn-Ser-Met-Asp-Pro-Glu-Ser-Thr. Rekombinantní molekula DNA obsahující některou takovou sekvenci DNA. Je také popsán způsob výroby proteinu ze skupiny látek TGF- β , farmaceutický prostředek, pro léčbu defektů kostí, chrupavek či zubů a pro hojení otevřených ran a obnovu tkání, který obsahuje protein ze skupiny látek TGF- β , pro něž je kódem sekvence DNA uvedená výše, stejně jako protilátka nebo její fragment, které jsou schopny specificky se vázat na protein, pro něž je kódem sekvence DNA.

CZ 287715 B6

Sekvence DNA, rekombinantní molekula DNA s jejím obsahem, způsob výroby proteinu ze skupiny látek TGF- β , farmaceutický prostředek s jeho obsahem, protilátka nebo její fragment a její použití

5

Oblast techniky

Tento vynález se týká sekvence DNA kódující protein ze skupiny látek TGF- β , rekombinantní molekuly DNA, která obsahuje takovou sekvenci DNA, způsobu výroby proteinu ze skupiny
10 látek TGF- β , farmaceutického prostředku pro léčbu defektů kostí, chrupavek či zubů a pro hojení otevřených ran a obnovu tkání, protilátky nebo jejího fragmentu, která je schopna specificky se vázat na protein, pro nějž je kódem výše zmíněná sekvence DNA a použití protilátky nebo jejího fragmentu pro diagnostické metody in vitro.

15

Dosavadní stav techniky

Skupina růstových faktorů TGF- β , zahrnující BMP (kostní morfogenetické proteiny, bone morphogenetic proteins), TGF a proteiny příbuzné inhibinu (Roberts a Sporn, Handbook of
20 Experimental Pharmacology 95, 419–472 /1990/), má zvláštní závažnost v širokém spektru léčebných postupů a aplikací. Tyto faktory se uplatňují v procesech, které souvisejí s hojením otevřených ran a obnovením tkání. Několik členů skupiny růstových faktorů TGF- β projevuje také tkáňovou induktivitu, zejména osteoinduktivitu a v důsledku toho pak hrají rozhodující úlohu v indukci vývoje chrupavek a kostí.

25

Různé růstové faktory, jako faktory příbuzné BMP a skupinu inhibinu, popisují Wozney v Progress in Growth Factor Research 1, 267–280 /1989/ a Vale a kol. v Handbook of Experimental Pharmacology 95, 419–472 /1990/.

30

Látky z těchto skupin sdílejí významnou strukturní podobnost. Prekursor proteinu je složen z N–koncové signální sekvence, propeptidu, a sekvence karboxylového konce, tvořené přibližně 110 aminokyselinami, která je následně z prekursoru odštěpena a představuje zralý protein. Látky těchto skupin jsou dále vymezeny rozsahem homologie aminokyselinové sekvence. Zralý protein obsahuje nejvíce zachovávané sekvence, zvláště pak sedm zbytků cysteinu, zachovávaných členy
35 této skupiny látek. Proteiny, podobající se TGF- β , jsou multifunkční, hormonálně aktivní růstové faktory. Také tyto proteiny sdílejí biologické aktivity, jako je schopnost chemotaktického přitahování buněk, diferenciací podpůrných buněk a jejich schopnost tkáňové indukce, například u chrupavek a kostí. US patent číslo 5 013 649 popisuje sekvence DNA, kódující osteoinduktivní proteiny, nazývané BMP–2 proteiny, a zveřejněný dokument WO89/10409 popisuje BMP proteiny BMP–3. Mnoho buněčných typů je kromě toho schopno syntetisovat proteiny,
40 podobající se TGF- β , a prakticky všechny buňky mají TGF- β receptory.

Obecně vzato projevují tyto proteiny strukturní odlišnosti, působící značné odchylky v jejich detailní biologické funkci. Kromě toho se nacházejí v širokém spektru různých tkání
45 a vývojových stádií. Proto mohou vykazovat rozdíly, týkající se jejich podrobné funkce, například vyžadovaného buněčného fyziologického prostředí, jejich životnosti, jejich cílů, jejich požadavků na pomocné faktory a jejich odolnosti vůči degradaci. I když bylo popsáno mnoho potenciálních tkáňově induktivních, zvláště osteoinduktivních proteinů, jejich přirozená úloha v organismu, a, což je důležitější, jejich lékařská závažnost musí být ještě podrobně objasněna.
50 Výskyt dosud neznámých látek skupiny TGF- β se vztahem k osteogenesi nebo diferenciaci a indukci jiných tkání je velice pravděpodobný. Hlavním problémem izolace těchto nových, TGF- β podobných proteinů je však ten, že jejich funkce ještě nemohly být popsány dostatečně přesně pro navržení rozlišujícího biologického stanovení. Z druhé strany by očekávaná homologie nukleotidové sekvence se známými členy dané skupiny látek k osteogenesi nebo

diferenciaci a indukci jiných tkání je velice pravděpodobný. Hlavním problémem izolace těchto nových, TGF- β podobných proteinů je však ten, že jejich funkce ještě nemohly být popsány dostatečně přesně pro navrzení rozlišujícího biologického stanovení. Z druhé strany by očekávaná homologie nukleotidové sekvence se známými členy dané skupiny látek rovněž nedostačovala k využití klasických metod hybridizace nukleových kyselin pro kontrolní testování. Další izolace a charakterizace nových proteinů, podobných TGF- β , je však naléhavě potřebná k získání celého souboru indukčních a diferenciacích proteinů, splňujících všechny vyžadované léčebné požadavky. Tyto faktory mohou být vhodně léčebně využity při vadách hojení a v léčbě degenerativních poruch kostí a/nebo jiných tkání, například ledvin a jater.

Technickým problémem, zásadně zdůrazňujícím předkládaný vynález, je tedy stanovení sekvencí DNA, které kódují nové členy skupiny proteinů, podobných TGF- β , s mitogenním a/nebo diferenciací induktivním, například osteoinduktivním účinkem.

15 Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je sekvence DNA, kódující protein ze skupiny látek TGF- β , zvolená ze souboru sestávajícího z

20 a) sekvence DNA, obsahující nukleotidy

ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA

25 se čtecím rámcem pro protein, začínajícím na prvním nukleotidu,

b) sekvence DNA, která je degenerovaná, co je výsledkem genetického kodu sekvence DNA uvedené v a),

30 c) sekvence DNA, která kóduje protein, který se odlišuje od proteinu, jenž je kódován NA sekvencí z a) pouze konservativními aminokyselinovými výměnami, a

d) sekvence DNA, která hybridizuje k sekvenci DNA uvedené v a) nebo b) a kóduje protein, který obsahuje sekvenci

35 Met-Asn-Ser-Met-Asp-Pro-Glu-Ser-Thr.

Výhodným provedením sekvence DNA je sekvence DNA obratlovců, sekvence DNA savců, obzvláště výhodně sekvence DNA primátů, člověka, vepře, skotu nebo hlodavců a přednostně i sekvence DNA krysí a myší, jakož i sekvence DNA, která kóduje zralý MP-52 protein, definovaný nukleotidy 845 až 1204 uvedenými v SEQ id. č. 1 popsané dále.

Předmětem tohoto vynálezu je dále rekombinantní molekula DNA, která obsahuje sekvenci DNA vymezenou výše.

45 Výhodným provedením je rekombinantní molekula DNA, kde uvedená sekvence DNA je funkčně navázána na sekvenci řídicí expresi.

Předmětem tohoto vynálezu je také způsob výroby proteinu ze skupiny látek TGF- β , který 50 spočívá v tom, že zahrnuje kultivaci hostitele obsahujícího rekombinantní DNA molekulu vymezenou výše, kterým je výhodně bakterie, houba, rostlinná buňka nebo živočišná buňka, a zpětné získání uvedeného proteinu TGF- β z kultury.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek pro léčbu defektů kostí, chrupavek či zubů a pro hojení otevřených ran a obnovu tkání, který obsahuje protein ze skupiny látek TGF- β , pro něž je kódem sekvence DNA vymezený výše, popřípadě v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

5

Předmětem tohoto vynálezu je také protilátka nebo její fragment, která je schopna specificky se vázat na protein, pro něž je kódem sekvence DNA vymezená výše.

10

Podle výhodného provedení protilátka nebo její fragment vymezený výše představuje monoklonální protilátku.

Předmětem tohoto vynálezu je konečně použití protilátky nebo jejího fragmentu vymezeného výše pro diagnostické metody in vitro.

15

Další rysy a výhody vynálezu budou zřejmé z popisu výhodných provedení a výkresů. Popis je uveden v širších souvislostech.

Přehled obrázků na výkresech

20

SEQ id. č. 1 značí nukleotidovou sekvenci MP-52, tj. sekvenci získanou z embrya, která odpovídá zralému peptidu, a většinu sekvence, kódující propeptid (peptidu) MP-52.

Část propeptidové sekvence na 5'-konci MP-52 nebyla dosud charakterizována.

25

SEQ id. č. 3 značí sekvenci aminokyselin v MP-52, odvozenou ze SEQ id. č. 1.

30

Obrázek 1 znázorňuje srovnání aminokyselinových sekvencí MP-52 a MP-121 s některými příbuznými proteiny. Obrázek 1a znázorňuje srovnání MP-52 s některými členy skupiny BMP proteinů, začínající od prvního ze sedmi uchovávaných cysteinů; obrázek 1b znázorňuje srovnání MP 121 s některými členy skupiny inhibinových proteinů. * značí stejnou aminokyselinu u všech srovnávaných proteinů; + značí aminokyselinu, která se alespoň u jednoho ze srovnávaných proteinů shoduje s aminokyselinou v MP-52 (obr. 1a) nebo v MP-121 (obr. 1b).

35

Obrázek 2 znázorňuje nukleotidové sekvence oligonukleotidového očka (primeru), užívaného tímto vynálezem a srovnání těchto sekvencí spolu se známými členy skupiny látek TGF- β . M značí A nebo C; S značí C nebo G; R značí A nebo G a K značí G nebo T. 2a zobrazuje sekvenci očka OD; 2b sekvenci očka OID.

40

MP-121 protein je předmětem naší přihlášky vynálezu č. PV 1069-97. Na tento dokument se také odkazuje v souvislosti se zmínkami o tomto proteinu a jeho přípravě nebo jakýchkoli aplikacích.

45

Předkládaný vynález se tedy týká nových proteinů, podobných skupině látek TGF- β , a stanoví sekvence DNA, obsažené v odpovídajících genech.

50

Ačkoli uvedené alelické, degenerované a hybridizované sekvence mohou vykazovat strukturální rozdíly, způsobené přirozenými mutacemi, jako jsou malé delece a substituce, obvykle budou mít v podstatě stejné užité vlastnosti, umožňující jejich použití k v zásadě stejným léčebným aplikacím.

55

V předkládaném vynálezu označuje výraz „hybridizace“ obvyklé hybridizační podmínky; přednost se dává podmínkám, používajícím koncentrací sole 6 x SSC při 62 °C až 66 °C, a následné jednohodinové promytí pomocí 0,6 x SSC s 0,1% SDS při stejné teplotě. Výraz „hybridizace“ se přednostně vztahuje na přesné hybridizační podmínky o koncentraci sole

4 x SSC při 62 °C až 66 °C, s následujícím jednohodinovým promytím pomocí 0.1 x SSC, 0,1% SDS při stejné teplotě.

5 Důležité biologické aktivity kódovaných proteinů zahrnují mitogenní a osteoinduktivní schopnost a mohou být určeny pomocí stanovení podle Robertse a spoluautorů, PNAS 78, 5339–5343, 1981, Seyedina a spoluautorů, PNAS 82, 2267–2271, 1985 nebo podle Sampathe a Reddih, PNAS 78, 7599–7603, 1981.

10 Předmětem předkládaného vynálezu, kterému se dává přednost, jsou sekvence DNA, jak byly dříve definovány, které lze získat od obratlovců, zvláště savců jako je vepř nebo kráva a od hlodavců, jako je krysa nebo myš, a zejména od primátů, jako je člověk.

Předmětem předkládaného vynálezu, kterému se dává zvláštní přednost, jsou sekvence DNA, označené jako MP-52 a MP-121, které jsou znázorněny v SEQ id. č. 1 a 2. Odpovídající přepisy 15 MP-52 byly získány z embryonální tkáně a kódují protein, vykazující značnou homologii aminokyselin se zralou částí proteinů, podobných BMP (viz obrázek 1a). Proteinové sekvence BMP2 (=BMP2A) a BMP4 (=BMP2B) popsal Wozney se spoluautory ve Science 242, 1528–1534, 1988. Odpovídající sekvence BMP5, BMP6 a BMP7 jsou popsány Celestem a spoluautory v Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9843–9847, 1990. Některé typické sekvenční homologie, 20 charakteristické jen pro známé sekvence BMP, byly nalezeny také v propeptidové části MP-52, zatímco jiné oblasti části prekursoru MP-52 vykazovaly od prekursorů BMP značné odlišnosti. mRNA, příslušející MP-121, byla detegována v jaterní tkáni a její odpovídající aminokyselinová sekvence projevuje homologii s aminokyselinovými sekvencemi inhibinových proteinových 25 řetězců (viz obrázek 1b). Sekvence cDNA, kódující proteiny podobné TGF-β, nebyly z jaterní tkáně dosud izolovány, což je pravděpodobně způsobeno nízkým výskytem specifických přepisů (transkriptů) v této tkáni. V embryonální tkáni však byly sekvence, kódující známé proteiny podobné TGF-β, nalezeny v poměrně velkém množství. Tvůrci vynálezu nedávno zjistili přítomnost souboru proteinů podobných TGF-β také v játrech. Vysoká základní hladina klonů, vztahujících se ke známým faktorům této skupiny, představuje hlavní obtíž při stanovení nových 30 sekvencí se vztahem k TGF-β z této tkáně a pravděpodobně i z dalších tkání. V předkládaném vynálezu bylo klonování provedeno dále popsanou metodou. Poté, co byla sekvence DNA klonována, přípravy hostitelských buněk, schopných vytvářet proteiny podobné TGF-β i tvorby těchto proteinů bylo snadněji dosaženo využitím známých technik rekombinace DNA. Ty zahrnují vytvoření plazmidů, potřebných k expresi a kódujících zmíněný protein, transformaci 35 hostitelské buňky tímto plasmidem, kultivaci transformované buňky ve vhodném kultivačním médiu a získání produktu s aktivitou podobnou TGF-β.

Vynález se tedy týká i rekombinantních molekul, zahrnujících výše popsané sekvence DNA, které mohou být vázány na sekvenci, která řídí expresi. Takové vektory mohou být použity 40 k produkci proteinů, podobných TGF-β, v trvale nebo přechodně transformovaných buňkách. K transformaci a následnému kultivačnímu procesu mohou být využity různé systémy živočichů, rostlin, hub a bakterií. Vektory exprese, které mohou být použity ve vynálezu, přednostně obsahují sekvence, nezbytné pro replikaci v hostitelské buňce a jsou autonomně replikovatelné. Přednost se také dává použití vektorů, které obsahují volitelné značkové geny, které mohou být 45 pro transformované buňky snadno vybrány. Nezbytný úkon je dobře známý lidem, orientujícím se v oboru.

Dalším cílem vynálezu je stanovení hostitelské buňky, transformované plasmidem exprese podle vynálezu a schopné produkovat protein ze skupiny látek TGF-β. K příkladům vhodných 50 hostitelských buněk patří různé eukaryotní a prokaryotní buňky, jako je *E. coli*, hmyzí buňky, rostlinné buňky, savčí buňky a houby, jako jsou kvasinky.

Dalším cílem vynálezu je určení proteinu ze skupiny látek TGF-β, kódovaného výše uvedenými sekvencemi DNA, který vykazuje biologické schopnosti jako je tkáňová induktivita, zejména

osteoinduktivita a/nebo mitogenní vlastnosti, využitelné případně k terapeutickým účelům. Výše uvedené schopnosti proteinu mohou kolísat v závislosti na tvorbě homologních nebo heterogenních dimerů. Takové struktury se mohou rovněž osvědčit jako vhodné pro klinickému využití. Sekvence aminokyselin proteinu ze skupiny látek TGF- β , kterému se dává zvláštní přednost, MP-52, je popsána v SEQ id. č. 3.

Dalším úkolem předkládaného vynálezu je stanovení metody produkce proteinů, podobných TGF- β . Taková metoda zahrnuje kultivaci hostitelské buňky, transformované DNA sekvencí podle předkládaného vynálezu, ve vhodném kultivačním médiu a vyčištění produkovaného proteinu, podobného TGF- β . Tato metoda tedy umožní produkci dostatečného množství požadovaného proteinu k použití pro léčebné účely nebo pro aplikace, používající postupy kultivace buněk, které vyžadují přítomnost růstových faktorů. Hostitelskou buňku je možné získat z bakterií jako je *Bacillus* nebo *Escherichia coli*, z hub jako jsou kvasinky, z rostlin jako je tabák, brambory nebo *Arabidopsis*, a od zvířat, zvláště z buněčných linií obratlovců, jako jsou Mo-, COS- nebo CHO buněčné linie.

Ještě dalším aspektem předkládaného vynálezu je stanovení zvláště citlivé metody k izolaci sekvencí DNA, odpovídající nízkému obsahu jednotlivých mRNA v příslušných tkáních. Metoda podle vynálezu vzniká spojením čtyř rozdílných kroků. Nejprve je nutné izolovat mRNA a použít ji v amplifikační reakci za přítomnosti oligonukleotidových oček (primerů). Sekvence oligonukleotidových oček obsahující degenerované sekvence DNA, odvozené od aminokyselinové sekvence proteinů, vztahující se ke genu, o nějž se jedná. Tento krok může vést k amplifikaci již známých členů genové skupiny a tyto nevyžadované sekvence je proto nutné eliminovat. K tomu slouží restrikční endonukleasy, známé tím, že dovedou dříve analyzované členy skupiny genů odbourat. Po úpravě amplifikované DNA těmito restrikčními endonukleasami jsou zbývající, žádoucí sekvence DNA izolovány elektroforesou v gelu, ve třetím kroku jsou opět zmoženy amplifikační reakcí a ve čtvrtém kroku jsou klonovány do vhodných vektorů pro sekvenování. Pro zvýšení citlivosti a účinnosti jsou druhý a třetí krok prováděny opakovaně, alespoň dvakrát při každém použití této metody.

V provedení, kterému se dává přednost, je výše popsáný isolační postup používán k izolaci sekvencí DNA z jaterní tkáně. Zvláštní přednost se dává provedení výše popsání postupu, kdy je jedno očko (primer), použití k PCR (polymerázové řetězové reakci, polymerase chain reaction) homologiní s polyA – koncovou částí mRNA, zatímco druhé očko obsahuje sekvenci genové specifickou. Techniky, využívané k provedení rozdílných kroků tohoto postupu, (jako amplifikační reakce nebo sekvenační techniky) jsou v oboru obecně známé a jsou popsány například Sambrookem se spoluautory v knize „Molecular Cloning: A laboratory manual“ z roku 1989, vydané nakladatelstvím old Spring Harbor Laboratory Press.

Dalším cílem předkládaného vynálezu je stanovení farmaceutických přípravků, obsahujících terapeuticky účinné množství proteinu ze skupiny TGF- β podle tohoto vynálezu. Podle volby může takový přípravek obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič. Takový léčebný přípravek může být použit k hojení otevřených ran a obnově tkání, stejně jako k hojení kostí, chrupavek, či zubních defektů, a to buď samostatně, nebo vázaný na vhodné nosiče a popřípadě spolu s jinými příbuznými proteiny nebo růstovými faktory. Léčebný přípravek podle vynálezu tedy může obsahovat MP-52 kódovaný protein ve spojení s MP-121 kódovaným proteinem, a podle volby i s jinými známými, biologicky aktivními látkami, jako je EGF (epidermální růstový faktor, epidermal growth factor), nebo PDGF (růstový faktor z krevních destiček, platelet derived growth factor); není však omezen obsahem pouze těchto látek. Protein, podobný TGF- β , může být dále klinicky využit jako supresor imunitní odpovědi, který by zabráňoval odvržení orgánových transplantátů. Farmaceutické přípravky, obsahující proteiny podle vynálezu, mohou být rovněž používány profylakticky anebo mohou být využity v kosmetické plastické chirurgii. Použití přípravku není nadto omezeno jen na člověka ale zahrnuje i zvířata, a to zvláště domácí zvířata.

Předmětem vynálezu je konečně také protilátka či fragment protilátky, které jsou schopné specificky se vázat na proteiny podle vynálezu. Způsoby získání takových specifických protilátek jsou obecně známy. Přednostně je taková protilátka monoklonální protilátkou. Uvedené protilátky nebo fragmenty protilátek mohou být využity v diagnostických metodách.

5

Následující příklady podrobně dokresluji podáváný vynález, ale neměly by být chápány jako jeho omezení.

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

15 Isolace MP-121

1.1 Celková RNA byla izolována z lidské jaterní tkáně (čtyřicetiletého muže) metodou podle Chirgwin a spoluautorů, Biochemistry 18, 5294–5299, 1979. Poly A⁺ RNA byla oddělena od celkové RNA pomocí oligo (dT) chromatografie podle pokynů výrobce (Stratagene Poly (A) Quick columns).

20

1.2 Pro reakci reversní transkripce byla poly A⁺ RNA (1 – 2,5 µg) z jaterní tkáně zahřata po dobu 5 minut na 65 °C a rychle ochlazena v ledu. Přidány byly reagenty reversní transkripce, obsahující ochrannou RNA v množství 27 U jednotek (Pharmacia), 2,5 µg oligo d(T)_{12–18} (Pharmacia), 5 x pufr (250 mM Tris/HCl o pH 8,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 5 mM každého dNTP; 600 mM KCl) a 20 jednotek reversní transkriptázy z viru ptačí myeloblastózy (AMV, Boehringer Mannheim) na µg poly (A⁺) RNA. Reakční směs (25 µl) byla inkubována 2 hodiny při 42 °C. Směs (pool) jaterní cDNA byla uchována při –20 °C.

25

30

1.3 Deoxynukleotidová očka (primery) OD a OID (obrázek 2), určená k zahájení amplifikační reakce, byla vytvořena na automatickém DNA-syntetizátoru firmy Biosearch. Vyčištění bylo provedeno pomocí denaturační elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a hlavní pruh byl z gelu izolován pomocí isotachoforézy. Oligonukleotidy byly určeny uspořádáním sekvencí nukleových kyselin známých členů skupiny látek TGF-β a volbou nejsilněji uchovávaných oblastí. Uspořádání takové oblasti je znázorněno na obrázku 2. K usnadnění klonování obsahovaly oba oligonukleotidy restrikční místa EcoR I a oligonukleotid OD obsahoval navíc restrikční místo Nco I na 5' konci.

35

1.4. V polymerázové řetězové reakci (PCR) byla v 50 µl reakční směsi použita jako templát jaterní směs DNA. Amplifikace byla provedena v soustavě, obsahující 1 x PCR pufr (16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 67 mM Tris/HCl o pH 8,8; 2 mM MgCl₂; 6,7 µM EDTA; 10 mM β-merkaptoethanol; 170 µg/ml BSA firmy Gibco), 200 µM každého dNTP (Pharmacia), 30 pmol každého oligonukleotidu (OD a OID) a 1,5 jednotky Taq polymerázy (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus). PCR reakce obsahovala jako výchozí materiál cDNA, odpovídající 30 ng poly (A⁺)RNA. Po překrytí reakční směsi vrstvou parafinu bylo provedeno 40 cyklů PCR reakce (cyklus 1: 80s 93 °C/40s, 52 °C/40s 72 °C; cykly 2–9: 60s 93 °C/40s 52 °C/40s 72 °C; cykly 10–29: 60s 93 °C/40s 52 °C/60s 72 °C; cykly 30–39: 60s 93 °C/40s 52 °C/90s 72 °C; cyklus 40: 60s 93 °C/40s 52 °C/420s 72 °C. Šest reakčních směsí PCR reakce bylo spojeno, vyčištěno následnou extrakcí stejnými objemy fenolu, směsí fenol/chloroform (1:1, objem : objem) a směsí chloroform/isoamylalkohol (24:1, objem:objem) a poté koncentrováno srážením ethanolem.

50

- 1.5 Polovina směsi (poolu) získané v PCR dostačovala pro odbourání restrikčními enzymy Sph I (Pharmacia) a AlwN I (Biolabs). Druhá polovina byla odbourána v sérii reakcí restrikčními enzymy Ava I (BRL), AlwN I (Biolabs) a Tfi I (Biolabs). Odbourání restrikčními endonukleasami probíhalo ve 100 μ l při 37 °C (pouze Tfi I při 65 °C) za pomoci 8 jednotek každého enzymu ve 2–12 hodinové reakci a v pufru podle doporučení výrobce.
- 1.6 Každý vzorek DNA byl elektroforeticky frakcionován za použití 4% agarosového gelu (3% agarosy FMC Nusieve, Biozym a 1% agarosa, BRL) v Tris–borátovém pufru (89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,0). Po obarvení ethidiumbromidem byly nerozštěpené amplifikační produkty (tvořené přibližně 200 páry bází; standard pro určení velikosti byl sledován souběžně) z gelu vyříznuty a izolovány fenolovou extrakcí: stejný objem fenolu byl přidán k vystřiženému vzorku agarosy, nařezanému na malé kousky, směs byla 10 minut mrazena, míchána a poté odstředěna. Vodná fáze byla uschována, zatímco interfáze byla znovu extrahována stejným objemem TE–pufru, odstředěna a obě vodné fáze byly spojeny. DNA byla dále čištěna dvojnásobnou extrakcí ze směsi fenol/chloroform a následně extrakcí ze směsi chloroform/isoamylalkohol.
- 1.7 Po srážení ethanolem byla jedna čtvrtina či pětina izolované DNA znovu amplifikována za podmínek stejných jako při první amplifikaci, pouze počet cyklů byl snížen na 13 (cyklus 1 80s 93 °C/40s 52 °C/40s 72 °C; cykly 2–12: 60s 93 °C/40s 52 °C/60s 72 °C; cyklus 13 60s 93 °C/40s 52 °C/420s 72 °C). Produkty reamplifikace byly vyčištěny, štěpeny pomocí stejných enzymů, které byly popsány výše a nerozštěpené produkty byly izolovány z agarosového gelu tak, jak bylo popsáno u produktů amplifikace. Reamplifikace, následující po restrikci a izolaci z gelu, byla jednou opakována.
- 1.8 Po poslední izolaci z gelu byly a amplifikační produkty odbourány pomocí 4 jednotek enzymu EcoR I (Pharmacia) v průběhu 2 hodin při 37 °C v pufru, doporučeném výrobcem. Jedna čtvrtina restrikční směsi byla navázána na vektor pBluescriptII SK+ (Stratagene), který byl podobně štěpen pomocí EcoR I. Po navázání bylo 24 klonů z každé enzymové kombinace dále analyzováno sekvenční analýzou. Vzorky, štěpené pomocí AlwN I a Sph I, neobsahovaly nové sekvence, pouze sekvence BMP6 a inhibinu β A. 19 identických nových sekvencí, které byly pojmenovány MP–121, bylo nalezeno ve vzorcích, štěpených pomocí Ava I, AlwN I a Tfi I. Jedna sekvence se od této převážně nalezené sekvence odlišovala záměnami dvou nukleotidů. Vazebná reakce a transformace v *E. coli* HB101 byla provedena podle Sambrooka a spoluautorů, Molecular cloning: A laboratory manual (1989). Transformanty byly vybrány na základě ampicilinové rezistence a plazmidové DNA byly izolovány standardním postupem (podle Sambrooka a spoluautorů, 1989). Analýza byla provedena sekvenací dvouvláknových plazmidů metodou „sekvenace zakončováním ideoxyribonukleotidového řetězce“ (dideoxyribonucleotide chain termination sequencing) pomocí sekvenační sady „Sequenase version 2,0“ (United States Biochemical Corporation).

Klon byl připojen ke 3'konci cDNA pomocí metody, podrobně popsané Frohmanem (Amplifications 5, 11–15, 1990, vyd. Perkin–Elmer Corporation). Stejná jaterní mRNA, jaké bylo použito k izolaci prvního fragmentu MP–121, byla reversně transkribována za použití očka (primeru), skládajícího se z oligodeoxythyminu (dT, 16 zbytků), vázaného na adaptorové očko (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACGAAGC(T)₁₆). Amplifikace byla uskutečněna za použití adaptorového očka (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACG) a vnitřního (internal) očka (GGCTACGCCATGAACTTCTGCATA) sekvence MP–121. Produkty amplifikace byla znovu amplifikována za použití navazujícího vnitřního očka (ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG) sekvence MP–121 a adaptorového očka. Produkty reamplifikace byly po restrikci pomocí Sph I klonovány ve stejně restrikčně štěpeném vektoru pT7/T3 U19 (Pharmacia) a sekvenovány za využití sekvenční sady „Sequenase Version 2,0“ (United States Biochemical Corporation). Klony se vyznačovaly překryvem své sekvence s 3'koncem známé sekvence MP–121.

Příklad 2

Isolace MP-52

- 5 Další sekvence cDNA, MP-52, byla izolována dříve popsaným postupem (viz Příklad 1) za použití RNA z lidské embryonální tkáně (stáří 8–9 týdnů). Reakce PCR obsahovala jako výchozí materiál cDNA, odpovídající 20 ng poly (A⁺)RNA. Reamplifikační krok byl opakován dvakrát pro obě enzymové kombinace. Po navázání bylo 24 klonů z každé enzymové kombinace dále analyzováno sekvenční analýzou. Vzorek, restriktivně štěpený pomocí AlwN I a Sph I poskytl
- 10 novou sekvenci, nazvanou MP-52. Ostatní klony obsahovaly převážně sekvenci BMP6 a BMP7. Vzorek, restriktivně štěpený účinkem Ava I, AlwN I a Tfi I nové sekvence neobsahoval, ale skládal se převážně ze sekvencí BMP7 a několika sekvencí inhibinu βA.

- Klon byl připojen ke 3'konci dříve popsaným postupem (Příklad 1). Stejná embryonální mRNA, jaké bylo použito k izolaci prvního fragmentu MP-52, byla reversně transkribována jako
- 15 v Příkladu 1. Amplifikace se uskutečnila za pomoci adaptorového očka (AGAATTCGCATGCATGGTCGACG) a vnitřní očka (CTTGAGTACGAGGCTTTCCACTG) sekvence MP-52. Produkty amplifikace byla znovu amplifikovány za použití navazujícího adaptorového očka (ATTCGCATGCCATGGTCGACGAAG) a návazného vnitřního očka (GGAGCCCCACGAATCATGCAGTCA) sekvence MP-52. Produkty reamplifikace byly po
- 20 restrikci pomocí Nco I klonovány ve stejné restriktivně štěpeném vektoru (pUC 19 (Pharmacia #27-4951-01) s pozměněným mnohočetným klonovacím místem, obsahujícím jediné restriktivní místo pro Nco I) a sekvenovány. Klony se vyznačovaly překryvem své sekvence se 3'koncem známé sekvence MP-52. Některé z těchto klonů obsahují posledních 143 párů basí 3'konce
- 25 sekvence, znázorněné v SEQ id. č. 1 a 0,56 kb (kilobasí) oblasti 3', která nepodléhá translaci (sekvence není uvedena). Jeden z nich byl použit jako sonda ke stanovení knihovny lidského genomu (Stratagene #946203) obvyklou metodou, podrobně popsanou Ausubelem a spoluautory (Current Protocols in Molecular Biology, vyd. Greene publishing Associates and Wiley-Interscience, 1989). Z 8×10^5 lambda fágů byl jeden fág (lambda 2.7.4), u něhož bylo ověřeno, že
- 30 obsahuje vsunutých asi 20 kb, izolován a uložen do rejstříku DSM (#7387). Tento klon obsahuje kromě sekvence, izolované uvedenou metodou amplifikace z mRNA, také informaci o další sekvenci směrem k 5'konci. Pro sekvenční analýzu byl subklonován fragment Hind III o přibližně 7,5 kb na stejné restriktivně štěpený vektor (Bluescript SK, Stratagene #212206). Tento
- 35 plasmid, nazvaný SKL 52 (H3) MP12, byl rovněž uložen do DSM (#7353). Sekvenční informace, odvozená z tohoto klonu, je znázorněna v SEQ id. č. 1. U nukleotidu č. 1050 se stanovená cDNA a příslušná genová sekvence liší jedním párem basí (cDNA: G; genová DNA: A). Genová sekvence je pokládána za správnou, což bylo rovněž potvrzeno sekvenováním amplifikované genové DNA z embryonální tkáně, použité k přípravě mRNA. Genová DNA obsahuje intron o velikosti asi 2 kb, umístěný mezi páry bází 332 a 333 v SEQ id. č. 1. Sekvence
- 40 intronu není uvedena. Správné spojení exon/exon bylo potvrzeno sekvenováním produktu amplifikace, odvozeného od cDNA, která zahrnuje tuto oblast. Tato sekvenční informace byla získána pomocí částečně upravené metody, podrobně popsané Frohmanem (Amplifications 5, 11–15, 1990, vyd. Perkin-Elmer Corporation). Stejná embryonální RNA, jaké bylo použito k izolaci 3'konce MP-52, byla reversně transkribována za použití vnitřního očka sekvence MP-
- 45 52, orientovaného ve směru 5' (ACAGCAGGTGGGTGGTGTGGACT). Koncová část, tvořená polyA, byla připojena na 5'konec prvního vlákna cDNA pomocí terminální transferázy. K provedení dvoustupňové amplifikace bylo v prvním kroku použito očko, složené z oligo dT a adaptorové očka (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACGAAGC(T₁₆)), v druhém kroku adaptorové očko (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACG) a vnitřní očko (CCAGCAGCCCA-
- 50 TCCTTCTCC) sekvence MP-52. Produkty amplifikace byly znovu amplifikovány za použití stejného adaptorového očka a navazujícího vnitřního očka (TCCAGGGCACTAATGTCAAACACG) sekvence MP-52. Poté byly reamplifikační produkty opět amplifikovány za použití návazného adaptorového očka (ATTCGCATGCCATGGTCGACGAAG) a návazného vnitřního očka (ACTAATGTCAAACACGTACCTCTG) sekvence MP-52. Konečné reamplifikační

produkty byly klonovány „otevřeným koncem“ ve vektoru (Bluescript SK, Stratagene #212206), restriktčně štěpeném pomocí EcoRV. Klony byly charakterizovány překryvem jejich sekvence s DNA fága lambda 2.7.4.

- 5 Plasmid SKL 52 (H3) MP12 byl 10. 12. 1992 uložen pod číslem 7353 v DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig.

Fág lambda 2.7.4. byl uložen v DSM pod číslem 7387 dne 13. 1. 1993.

10

Příklad 3

Zkoušela se možnost vývoje kostí, založená na ektopické tvorbě kosti in vivo. Tato tvorba může být vyvolána například implantací demineralizované základní hmoty kosti (Urist, Science 150, 893–899 (1965)). Kombinací neaktivní základní hmoty s proteiny vyvolávajícími tvorbu kosti může být vyvolán stejný proces, jako například popisuje Sampath a kol., PNAS 78, 7599–7603 (1981). Tento proces tvorby kostí je stejný jako embryonální enchondrální tvorba kostí a zhojení kostí dospělých. Tato metoda tím nabízí možnost vyzkoušet in vivo proteiny na možnost vyvolat tvorbu kosti.

20

Pro tento experiment se použil MP–52 protein, který byl získán expresí pomocí virů Vaccinia, částečně vyčištěn a implantován.

K tomu bylo použito buněk 143B (HuTk–, ATCC CRL 8303) v kultivačních miskách a otočných nádobách až do soutoku a byly infikovány rekombinantními viry Vaccinia v počtu odpovídajícím počtu buněk, propláchnuty a ponechány akumulovat MP–52 přibližně 20 hodin v MEM (Gibco BRL, asi 1 ml na 10^6 buněk). Jako kontrolní stanovení byl použit stejný počet virů infikovaných divokým typem. Přebytek buněk kultury (kondicionované prostředí) byl shromážděn z násady a odstředěn (přetížení 40 000 g po dobu 30 minut za teploty 4 °C). K odstranění virů byl přebytek filtrován přes anorganický filtr (velikost pórů 0,1 μ m, Whatman, Anotop 25). K čištění MP–52 proteinu byly přebytky nakonec uvedeny na konečnou koncentraci 50 mM Tris pH 7,0, 100 mM chloridu sodného a 6 M močoviny a na vloženy na sloupec heparinu (HiTrapTM, Pharmacia, #17–0407–01), kde byly ekvilibrovány v pufru A (50 mM Tris, pH 7,0, 100 mM chloridu sodného a 6 M močoviny). Naplněný sloupec byl promyt pufr A a eluován lineárním gradientem do 100 % pufru B (50 mM Tris, pH 7,0, 600 mM chloridu sodného a 6 M močoviny) při rychlosti průtoku 0,5 ml/min během 50 minut (2,5 ml na frakci). Westrenblot analýzou bylo přezkoušeno, že MP–52 je reprodukovatelně eluován převážně ve 2 frakcích při zhruba 250 až 400 mM chloridu sodného. Alikvoty těchto frakcí byly rovněž přezkoušeny, podle údajů výrobce, 15% gelem polyakrylamidu obarveného stříbrem (Silver Stain–II, Daiichi #SE140000) a frakce byly shromážděny. Porovnatelné frakce po vyčištění od kondicionačního prostředí po infekci virem divokého typu byly stejně tak zachyceny v gelu obarveném stříbrem.

MP–52 protein, popřípadě odpovídající ještě kontaminovaný protein, nacházející se také v přebytku buněčné kultury infikované divokým typem, předčištěný chromatografií na heparin sepharose, byly dále přečištěny pomocí reverzní fáze vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). K tomu byl C8–sloupec (Aquapore RP300, Applied Biosystems, velikost částic 7 μ m, velikost pórů $300 \cdot 10^{-1}$ nm) ekvilibrován 10% pufr B (pufr A: 0,1% kyselina trifluoroctová, pufr B: 90% acetonitril, 0,1% kyselina trifluoroctová). Po naplnění kolony se zachycenými frakcemi obsahujícími MP–52 ze sloupce heparinu, byla kolona vydatně promyta 10% pufr B. Vázaný protein byl eluován s tímto gradientem: 10 až 50% pufr B po dobu 20 minut a 50 až 100% pufr B po dobu 50 minut. Byly shromážděny frakce do 500 μ l a analyzovány jak Westernblot analýzou, tak také gely obarvenými stříbrem. Protein MP–52 byl eluován za zvolených podmínek přibližně v rozmezí přibližně od 55 do 65 % acetonitrilu. Frakce

s MP-52 byly zachyceny. Stejně bylo provedeno s odpovídajícími frakcemi z kontrolního čištění přebytku buněčné kultury buněk infikovaných viry divokého typu.

Částečně vyčištěný MP-52 protein nebo kontrolní protein byl rekonstituován se základní hmotou a implantován krysám, aby byl podán důkaz o schopnosti tvorby chrupavek a kostí. K tomu byla použita základní hmota kostí od krys, která byla preparována v podstatě podobně, jako popisuje Sampath a kol., PNAS 78, 7599–7603 (1981) a Sampath a kol., PNAS 80, 6591–6595 (1983). Kostí krys (femur a tibie) byly demineralizovány po dobu 24 hodin 0,6M kyselinou chlorovodíkovou a nakonec byl ještě odstraněn přítomný kostní morek. Po promytí vodou a tříhodinovém odstraňování tuku směsí chloroformu a methanolu v poměru 1:1 byly kosti usušeny na vzduchu, ochlazené na hlubokou teplotu rozemlety na prášek v mlýně a sítím odděleny částice o velikosti 400 až 1000 μm . Nakonec byla základní hmota extrahována po dobu 7 dnů za teploty místnosti v 4M guanidiniumhydrochloridu v přítomnosti inhibitorů proteázy. Po rozsáhlém promytí vodou byla základní hmota lyofilizována a uchována při teplotě 4 °C. Takto zpracovaná základní hmota již neukazuje žádnou aktivitu vyvolávající tvorbu kosti.

Protein může být kombinován různými metodami známými odborníkovi s extrahovanou základní hmotou kosti. V tomto případě byl MP-52 protein nebo kontrolní protein, který byl vyčištěn vysoko účinnou kapalinovou chromatografií jak přes heparin sephadosu, tak také reverzní fází, spojen v roztoku acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové po eluování vždy s 25 mg základní hmoty na implantát, dobře promyt, vysušen za hluboké teploty a lyofilizován. MP-52 spojený se základní hmotou byl uchováván při teplotě 4 °C. Pro implantaci byl použit MP-52 vázaný na základní hmotu dvou přibližně 3 měsíce starých krys (Whistar), které byly ošetřeny intramuskulární injekcí narkotizačního přípravku (0,2 ml Rompun (Bayer) smíseno s 0,5 ml Ketanest 50 (Parke Davis)) v objemu 0,14 ml na 100 g tělesné hmotnosti. Pro implantát byly připraveny bilaterální kapsy v břišním svalstvu (pod thorax). MP-52 vázaný na základní hmotu (asi 2 až 4 μg podle odhadu na základě Westernblot analýzy), stejně jako odpovídající kontrolní protein vázaný na základní hmotu byl zvlhčen 0,9% roztokem chloridu sodného (Delta Pharma) a převeden do kapsy ve sval. Svalová kapsa, stejně jako potřebný hlavní řez byly nakonec zašity. Krysám byla posílena imunita cyklosporinem A (Sandimmun).

Po 18 nebo 26 dnech byly implantáty z krys vyjmuty a fixovány pro histologické zkoušky. Ježto po 26 dnech se dalo již předpokládat, že implantát s MP-52 povede k makroskopické tvorbě kosti, byl tento uložen ke zhotovení tenkých řezů do methylmethakrylátu a jiné implantáty byly zalaty do parafinu. Mineralizovaná chrupavková a kostní tkáň byly zdůrazněny obarvením na černo barvicí technikou podle von Kossa (Romeis, B., Mikroskopische Technik, vyd. Böck, P., Urban a Schwarzenberg, Mnichov, Baltimore, Vídeň (1989)). Při trichromovém barvení podle Masson-Goldera (Romeis, B., Mikroskopische Technik, vyd. Böck, P., Urban a Schwarzenberg, Mnichov, Baltimore, Vídeň (1989)) byla mineralizovaná kostní tkáň a kolagen vybarveny světle zeleně, osteoid je červený a cytoplazma hnědá s odstínem do červená. Obě techniky barvení byly použity na implantátech z obou krys. S oběma technikami barvení se mohla na obou pokusných zvířatech zřetelně dokázat tvorba kostí a chrupavek v implantátech, které obsahovaly MP-52. Odpovídající implantáty s kontrolním proteinem neukazovaly na žádnou tvorbu kostí nebo chrupavek. Podíl předchůdce chrupavky s chondrocyty a oblastmi chrupavek s počínající tvorbou extracelulární základní hmoty a její mineralizací v koncentrických kruzích je v MP-52 implantátu po 18 dnech vyšší než v případě 26 dnů. Avšak také v implantátech po 18 dnech je již dokazatelná zralá tkáň kosti s vektorielní tvorbou osteoidu, stejně jako jednotlivé osteocyty v kostích. Dále jsou rozeznatelné uzavřené kůstky se začínající tvorbou kostního morku. U implantátu po 26 dnech lze dokázat také ještě oblasti chrupavky se začínající tvorbou základní hmoty a zvápňováním, jejichž podíl se však zřetelně zvyšuje na zeleně vybarvené kostní tkáni s osteocyty a okraji osteoidů. V implantátu je prokazatelná tvorba kostního morku s výskytem jednotlivých tukových buněk. Ke znázornění se odkazuje na přiložené obrázky.

Pokus ukazuje, že rekombinantně připravený MP-52 v kombinaci se základní hmotou je s to vyvolat enchondrální tvorbu kosti.

Přehled obrázků na výkresech

5 Obr. 3 znázorňuje stav 18 dní po implantaci, vybarveno podle von Kassa, při stonásobném zvětšení.

Obr. 4 znázorňuje stav 26 dní po implantaci, vybarveno podle Masson–Goldnera, při osmdesátinásobném zvětšení.

10

Obr. 5 znázorňuje stav 26 dní po implantaci, vybarveno podle Masson–Goldnera, při třístapadesátinásobném zvětšení.

Na obrázcích je použito těchto zkratk:

15

Bm: diferencující se kostní morek,

Ch: hypertrofní chondrocyt,

Cc: mineralizovaná chrupavka,

Ma: zbytek neaktivní základní hmoty kosti,

20

Mc: svalová tkáň,

Ob: osteoblast,

Oc: osteocyt,

Os: kůstka naplněna diferencujícím se kostním morkem.

25

SEQ id. č. 1

TYP SEKVENCE: nukleotid

DÉLKA SEKVENCE: 1207 párů bází

30

TYP VLÁKNA: dvojité

TOPOLOGIE: lineární

MOLEKULÁRNÍ TYP: DNA

PŮVODNÍ ZDROJ: –

35

ORGANISMUS: lidský

BEZPROSTTTŘEDNÍ POKUSNÝ ZDROJ: embryonální tkáň

VLASTNOSTI: Kódová sekvence lidského proteinu podobného TGF- β (MP-52)

40

ACCGGGCGGC	OCTGAACCCA	AGCCAGGACA	COCTCCCCAA	ACAAGGCAGG	CTACAGCCCC	60
GACTGTGACC	CCAAAAGGAC	AGCTTCCCCG	AGGCAAGGCA	CCCCAAAAG	CAGGATCTGT	120
CCCCAGCTCC	TTCTGTCTGA	AGAAGGOCAG	GGAGCCCCGG	CCCCACGGAG	AGCCCCAAGGA	180
GOOGTTTCGC	CCACCCCCCA	TCACACCCCA	CGGTACATG	CTCTCGCTGT	ACAGGAOGCT	240
GTCOGATGCT	GACAGAAAGG	GAGGCAACAG	CAGCGTGAAG	TTGGAGGCTG	GOCTGGOCAA	300
CACCATCACC	AGCTTTTATG	ACAAAGGGCA	AGATGACCGA	GGTCCCGTGG	TCAGGAAGCA	360
GAGGTACGTG	TTTGACATTA	GTGCCCCGGA	GAAGGATGGG	CTGCTGGGGG	CCGAGCTGGG	420
GATCTTGGGG	AAGAAGCCCT	CGGACACGGC	CAAGOCAGCG	GGCCCCGGAG	GCGGGCGGGC	480
TGCCCCAGCTG	AAGCTGTCCA	GCTGCCCCAG	CGGCGGCGAG	CCGGCCTCCT	TGCTGGATGT	540
GCGCTCCGTG	CCAGGCTGGG	ACGGATCTGG	CTGGGAGGTG	TTGACATCT	GGAAGCTCTT	600
CCGAACTTTT	AAGAACTGGG	CCAGCTGTG	CTGGAGCTG	GAGGCTGGG	AAAGGGGCGAG	660
GGCGTGGGAC	CTCCGTGGGC	TGGGCTTGGG	CCGCGCGGCG	CGGCAGGTCC	ACGAGAAGGC	720
CCTGTTCCTG	GTGTTTGGGC	GCACCAAGGA	ACGGGACCTG	TTCTTTAATG	AGATTAAGGC	780
CCGCTCTGGC	CAGGACGATA	AGACCGTGTA	TGAGTACCTG	TTGAGCCAGC	GGCGAAAAGG	840
GCGGGCCCCA	CTGGCCACTC	GCCAGGGCAA	GCGACCCAGC	AAGAACTTTA	AGGCTCGCTG	900
CAGTGGGAAG	GCATGTCATG	TCAACTTCAA	GGACATGGGC	TGGGAGGACT	GGATCATGGC	960
ACCCCTTGAG	TACGAGGCTT	TCCACTGGGA	GGGCGTGTC	GAGTTCCCAT	TGCGCTCCCA	1020
CCTGGAGGOC	ACGAATCATG	CAGTCATCCA	GACCTGATG	AACTCCATGG	ACCCCGAGTC	1080
CACACACCC	ACCTGCTGTG	TGCCCCAGCG	GCTGAGTCCC	ATCAGCATCC	TCTTCATTTA	1140
CTCTGCCAAC	AACTGGGTGT	ATAAGCAGTA	TGAGGACATG	GTGCTGGAGT	CGTGTGGCTG	1200
CAGGTAG						1207

SEQ id. č. 3

- 5 TYP SEKVENCE: aminokyselina
DĚLKA SEKVENCE: 401 aminokyselin

PŮVODNÍ ZDROJ: -

ORGANISMUS: lidský

- 10 BEZPROSTŘEDNÍ POKUSNÝ ZDROJ:

VLASTNOSTI: Lidský protein podobný TGF- β (MP-52)

PGGPEPKRPH	PPQIRQATAR	TVTPKGQLPG	GPAPPKAGSV	PSSFLLKKAR	EPGPFREPKE	60
PFRPPPIIPH	EYMLSLYRIL	SDADRKGGNS	SVKLEAGLAN	TTTSFIDKGQ	DDRGFVVRKQ	120
RYVFDISALE	KDGLLGAELR	ILRKKPSUTA	KPAAPGGGRA	AQLKLSSCPG	GRQPASLLDV	180
RSVPGLDGGG	WEVFDIWKLF	RNEKNSAQLC	DELEAWERGR	AVDLRGLGFD	RAARQVHEKA	240
LFLVFGRTKK	RDLEFFNEIKA	RSGQDDRTVY	EYLFSSRRKR	RAPLATRQGG	RPSKILKARC	300
SRKALEVNEK	DMGWDDWIIA	PLEYEAFHCE	GLCEFFLRSH	LEPTNHAIVQ	TLNNSMDPES	360
TPPTCCVPTP	LSPISTILFID	SANNVVKQY	EDMVVESGCG	R		401

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sekvence DNA, kódující protein ze skupiny látek TGF- β , zvolená ze skupiny sestávající ze
 - a) sekvence DNA, obsahující nukleotidy

ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA
 - b) sekvence DNA, která je degenerovaná, co je výsledkem genetického kodu sekvence DNA uvedené v a),
 - c) sekvence DNA, která kóduje protein, který se odlišuje od proteinu, jenž je kódován DNA sekvencí z a) pouze konservativními aminokyselinovými výměnami, a
 - d) sekvence DNA, která hybridizuje k sekvenci DNA uvedené v a) nebo b) a kóduje protein, který obsahuje sekvenci

Met-Asn-Ser-Met-Asp-Pro-Glu-Ser-Thr.
2. Sekvence DNA podle nároku 1, která je sekvencí DNA obratlovců, sekvencí DNA savců, výhodně sekvencí DNA primátů, člověka, vepře, skotu nebo hlodavců a přednostně i sekvencí DNA krysí a myší.
3. Sekvence DNA podle nároků 1 nebo 2, která kóduje zralý MP-52 protein, definovaný nukleotidy 845 až 1204 uvedenými v SEQ id. č. 1.
4. Rekombinantní molekula DNA, která obsahuje sekvenci DNA podle některého z nároků 1 až 3.
5. Rekombinantní molekula DNA podle nároku 4, kde uvedená sekvence DNA je funkčně navázána na sekvenci řídící expresi.
6. Způsob výroby proteinu ze skupiny látek TGF- β kódovaného sekvencí DNA podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se kultivuje hostitel obsahující rekombinantní DNA molekulu podle nároků 4 nebo 5, kterým je výhodně bakterie, houba, rostlinná buňka nebo živočišná buňka, a izoluje se uvedený protein TGF- β z kultury.
7. Farmaceutický prostředek pro léčbu defektů kostí, chrupavek či zubů a pro hojení otevřených ran a obnovu tkání, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje protein ze skupiny látek TGF- β , pro něž je kódem sekvence DNA podle některého z nároků 1 až 3, popřípadě v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.
8. Protilátka nebo její fragment, která je schopna specificky se vázat na protein, pro něž je kódem sekvence DNA podle některého z nároků 1 až 3.
9. Protilátka nebo její fragment podle nároku 8, kde jde o monoklonální protilátku.
10. Použití protilátky nebo jejího fragmentu podle nároku 9 pro diagnostické metody in vitro.

Obrázek 1a

	10	20	30	40	50
MP 52	CSRKALEVNF	KDMGDDWII	APLEYAFEC	EGLCEPILRS	HLEPTNEAVI

EMP 2 CKRHPLYVDF SDVGNDWTV APPGYEAFYC HGECFFPLAD ELNSTEATV

EMP 4 CRRESLYVDF SDVGNDWIV APPGYQAFYC EGDCPFPLAD ELNSTNEAIV

BMP 5 CKKHELYVSF RDLGQDWII APEGVAAFYC DGECSFPLNA HMAATNEAIV

BMP 6 CRKBELYVSF ODLGWDWII APKGYAANYC DGECSFPLNA HMNATNEAIV

EMP 7 CKKHELYVSF RDLGQDWII APEGYAAAYC EGECAFFLNS YMNATNEAIV

☆ + ☆ ☆ ☆ ☆ ☆☆ ☆☆☆+ ☆☆ ☆ ☆+ ☆ + ☆ ☆ ☆☆☆ + + + ☆☆☆

	60	70	80	90	100
MP 52	OTLANSMDPE	STPTOCVPT	RLSPISILEI	DSANNVYKO	YEDMVVESOG CR

BMP 2 OTLVNSVNS- KIPKACVPT ELSAISMLYL DENEKVVILKN YODMVVEGOG CR

BMP 4 QTLVNSVNS- SIPKACCVPT ELSAISMLYL DEYDKVVLKN YQEMVVEGCG CR

BMP 5 QTLVHLMFPD HVPKPCAPT KLNALSPLYF DDSSNVILKK YRNMVVRSCG CH

BMP 6 QILVHLMNPE YVPRQCAPT KLNALSPLYE DENSNVILKK YRNMVVRACG CH

BMP 7 QTLVHFINPE TVPKPOCAPT QLNALSPLYF DDSSNVILKK YFNMVVRAG CH

*** ~~+++~~ ++ + * **++** *+ ** *

Obrázek 1b

	10	20	30	40	50
MP121	IQPEGYAMNF	CIGOCPLRIA	GMPGIAASFH	TAVINLLKAN	TAASTTGGGS
Inhib3A	IAPSGYHANY	CEGECPSHIA	GTSGSSLSFH	STVINRYMR	GESPTANLKS
Inhib3B	IAPTGYGNY	CEGSCPAYIA	GVPGSASSFH	TAVINQYMR	GLNF-GTVNS
Inhibα	VYPPSFIFHY	CHGGGGLHIP	——PNLSLP	VPGAPPIPAQ	PYSLLPGAQP
	+ * ++	+ * * *++++	+ ++ + *** +++	+ +	+ +
	60	70	80	90	
MP121	CC—VPTARR	PLSLLYYDRD	SNIVKRD-IP	DMVVEACGCS	
Inhib3A	CC—VPIKLR	PMSMLYIDG	QNLIKRD-IQ	NMIVEBOGCS	
Inhib3B	CC—IPTKLS	TMSMLYEDDE	YNIVKRD-VP	NMIVEBOGCA	
Inhibα	CCAALPGIMR	PLEVRTISDG	GYSFKYETVP	NLLIQBCACI	
	**	+++ + +++ +++++	+++* + ++ + ++ ***+		

Obrázek 2a

	Eco RI Nco I
OD	ATGAATTCCCATGGACCTGGGCTGGAAKGAATGGAT
BMP 2	ACGTGGGGTGGAAATGACTGGAT
BMP 3	ATATTGGCTGGAGTGAATGGAT
BMP 4	ATGIGGGCTGGAAATGACTGGAT
BMP 7	ACCTGGGCTGGCAGGACTGGAT
TGF-β1	AGGAOCTGGGCTGGAGTGGAT
TGF-β2	GGGATCTAGGGTGGAAATGGAT
TGF-β3	AGGATCTGGGCTGGAGTGGGT
inhibin α	AGCTGGGCTGGGAACGGTGGAT
inhibin β _A	ACATGGGCTGGAAATGACTGGAT
inhibin β _B	TCATGGGCTGGAAAGACTGGAT

Obrázek 2b

	Eco RI
OID	ATGAATTGAGCTGGGTSGGSRACAGCA
BMP 2	GAGTTCGTGGGGACACAGCA
BMP 3	CATCTTTTCCTGGTACACAGCA
BMP 4	CAGTTCAGTGGGCACACAACA
BMP 7	GAGCTGGGTGGGGGCACAGCA
TGF-β1	CAGGGCTGGGGCAAGCAGCA
TGF-β2	TAAATCTTGGGACAGCAGCA
TGF-β3	CAGGTCTGGGGCAAGCAGCA
inhibin α	COCTGGGAGAGCAGCACAGCA
inhibin β _A	CAGCTTGGTGGGCACACAGCA
inhibin β _B	CAGCTTGGTGGGAATGCAGCA



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Konec dokumentu
