

(19)



(10) **LT IP1517 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1517** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 14/435**
C12Q 1/68
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 03**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: **532285, 1990 06 01, US**
676647, 1991 03 28, US
700677, 1991 05 15, US
PCT/US91/03896, 1991 06 03, US
5011423, 1992 01 31, SU
- (71) Pareiškėjas:
**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., 777 Old Saw Mill Road, Tarrytown,
NY 10591-6707, US**
- (72) Išradėjas:
Samuel DAVIS, US
Stephen P. SQUINTO, US
Mark E. FURTH, US
George D. YANCOPOULOS, US
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, Gedimino pr. 45-6, LT-01109, Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
**Nukleino rūgščių molekūlės, baltymo molekūlės, organizmai, ląstelės,
monokloninis antikūnas, identifikacijos metodai, analizės sistemos, modelinės
sistemos, diagnostiniai metodai, farmacinės kompozicijos**
- (57) Referatas:
—

NUKLEININIŲ RŪGŠČIŲ MOLEKULĖS, BALTYMO MOLEKULĖS,
ORGANIZMAI, LASTEĖS, MONOKLONINIS ANTIKŪNAS, IDENTIFIKACIJOS
METODAI, ANALIZĖS SISTEMOS, MODELINĖS SISTEMOS, DIAGNOSTINIAI
METODAI, FARMACINĖS KOMPOZICIJOS.

Sis išradimas siejasi su ciliarinio neurotrofinio faktoriaus receptoriumi (ciliary neurotrophic factor receptor, CNTFR) ir nustato šio receptoriaus nukleininį rūgščių, o taip pat aminorūgščių sekas. Be to, išradimas apima: (1) analizės sistemas, skirtas ciliarinio neurotrofinio faktoriaus (ciliary neurotrophic factor, CNTF) aktyvumui aptikti; (2) eksperimentines modelines sistemas, kuriomis tirama fiziologinė CNTF rolė; (3) techninius diagnostikos sprendimus, skirtus neurologinių būsenų, susijusių su CNTF, identifikavimui; (4) neurologinių ir raumeninių susirgimų, susijusių su CNTF, terapeutinius gydymo sprendimus; ir (5) molekulių, homologiškų CNTF ir CNTFR identifikavimo metodus.

Ciliarinis neurotrofinis faktorius (CNTF) - tai baltymas, specifiškai būtinas viščiuko embriono ciliarinio ganglijaus neuronų išgyvenimui laboratorinėmis sąlygomis (in vitro), žiūr.: Manthorpe et al.- J.Neurochem. 1980, V. 34, p.69-75. Ciliarinis ganglijas anatomiškai išsidėstęs akių orbitos ertmėje. Jis yra tarp išilginio rektuso (rectus) ir optinio nervo apvalkalo; prie jo ateina parasimpatiniai nerviniai pluoštai nuo akies judinančio nervo, kuris jaudina ciliarinį raumenį, o taip pat vyzdžio sfinkterį (spinoter pupillae).

Nustatyta, kad ciliarinio ganglijaus neuronai priklauso toms neurolastelinėms poluliacijoms, kurioms būdingas apibrėžtas lastelių atmirimo periodiškumas. Stebėjimo rezultatai patvirtino, kad pusė viščiuko ciliarinio ganglijaus neuronų, esančių aštunta para besivystančiame embrione (E8), atmirdavo keturiolikta para (E14), žiūr.: Landmesser & Pilar,- J.Physiol. 1974, V.241, p.737-749. Siame laikotarpyje ciliarinio ganglijaus neuronai formuoja ryšius su savo tiksliniais audiniais, būtent, su ciliariniu kūnu ir ohoriodiniu (ohoriod) akies apvalkalu. Landmeseris ir Pilaras aptiko, kad pašalinus akį iki nurodyto lastelių atmirimo periodo pabaigos, pilnai prarandami ciliarinio ganglijaus neuronai ipsilateraliniu (ipsilateral) ganglijumi, žiūr.: Landmesser & Pilar, - J.Physiol.

1974, V.241, p.751-736. Priešingai, Narayanan ir Narayana stebėjo, kad ciliarinio ganglijaus neuronų lastelių atmirimą galima pris-
tabdyti, persodinant ir įauginant papildomą pradinę akies medžiagą
(primordium) ir tuo būdu padidinant tikslinio audinio kiekį,
žiūr.: Narayanan & Narayana, - J. Embryon. Ex. Morphol. 1978, V.44,
p.53-70. Šie rezultatai siejasi su neurotrofinio faktoriaus, vei-
kiančio į ciliarinio ganglijaus neuronus, tikslinio audinio dari-
niu.

Buvo nustatyta, kad, dirbtinai kultivuojant ciliarinio gang-
lijaus neuronus, jų išgyvenimui reikia ypatingo faktoriaus arba
faktorių. Ciliarinio neurotrofinio faktoriaus (CNTF) arba faktorių
aktyvumas buvo identifikuotas viščiuko raumeninių lastelių prepa-
rate (žiūr.: Helfand et al., - Dev.Biol. 1976, V.50., p.541-547;
Helfand et al., - Exp.Cell.Res. 1978, V.113, p.39-45; Bennet &
Nuroime, - Brain Res. 1979, V.173, p.543-548; Nishi & Berg, Nature,
1979, V.277, p.232-234; Varon et al., - Brain Res. 1979, V.173,
p.29-45); raumenų ekstraktuose (žiūr.: MoLennon & Hendry, -
Neurosci Lett. 1978, V.10, p.269-273); viščiuko embriono ekstrakto
(žiūr.: Varon et al., - Brain Res., 1979, V.173, p.29-45; Tuttle et
al., - Brain Res., V.183, p.161-180); pagaliau, širdies audinio
lastelių preparate (diskusijų duomenys, žiūr.: Adler et al., -
Science 1979, V.204, p.1434-1436; Barbin et al., - J.Neurochem.,
1984, V.43, p.1468-1478.)

Adleris ir bendr. panaudojo kultivavimo lėkštelėse su mikro-
duobutėmis, turinčiomis ciliarinio ganglijaus neuronų kultūras,
analizės sistemą, tam kad pademonstruotų aptiktus viduakinius
tikslinio audinio turtingus CNTF, sužadinančiu to ganglijaus neu-
ronus, šaltinius, žiūr.: Adler et al., Nature, 1979, V.204,
p.1434-1436. Dvylikos parų embrione yra daugiau negu 8000 trofi-
nių vienetų(TV), o akies audinyje - 2500 TV, be to, matomai, ak-
tyvumas lokalizuotas fragmente, apimančiame ciliarinį kūną ir
ohoriodinį apvalkalą.

Toliau, Barbinas ir bendr. pranešė apie medžiagos su padidin-
tu CNTF kiekiu išskyrimo iš viščiuko embriono akies audinio meto-
diką, žiūr.: Barbin et al., - J.Neurochem., 1984, V.43, p.1468-
1478. Nustatyta, kad CNTF aktyvumas siejasi su audiniais, neprik-
lausančiais ciliariniam ganglijui ir apimančiais, pavyzdžiui,
sėdmeninį žiurkės nervą, žiūr.: Williams et al., - Int.J.Develop.

Neurosci, 1984, V.218, p.460-470. Mentorpi ir bendr. paskelbė apie aktyvaus gyvulinio oiliarinio neurotrofinio faktoriaus (CNTF) išskyrimą iš sėdmeninio suaugusios žiurkės nervo, panaudojant fragmentacijos metodiką, panašią į tą, kuri buvo panaudota, išskiriant aktyvų CNTF iš viščiuko akies, žiūr.: Manthorpe et al.,- Brain Res. 1986, V.367, p.282-286. Be to, Votersas ir Hendris aprašė metodą, kai maždaug 20000 kartų padidinamas CNTF iš buliaus širdies audinio aktyvumas tokiomis sąlygomis, kurios artimos natūralioms; tuo pačiu panaudojamas heparininės chromatografijos metodas, žiūr.: Watters & Hendry,- J.Neurochem., 1987, V.49, p.705-713. CNTF aktyvumas taip pat buvo identifikuotas pažeistame smegenų audinyje, žiūr.: Manthorpe et al.,- Brain Res., 1983, V.3, p.2219-2229. Remiantis audinių ekstraktų preparatuose esančiu aktyvumu, primenančiu CNTF aktyvumą, buvo aprašyta identifikavimo western-blot metodu technika kartu su baltymų, rodančių CNTF aktyvumą, juostų identifikavimu; metodas remiasi oeliuliozės juostelių "pri-siuvimu" prie kultivavimo lėkštelės su GS neuronais turinio ir plotų, užimtų išlikusiomis ląstelėmis, nustatymu, panaudojus dažus, specifiskus gyvoms ląstelėms, žiūr.: Carnow et al.,- J.Neurochem., 1985, V.5, p.1965-1971; Rudge et al.,- Develop. Brain Res., 1987, V.32, p.103-110. Naudodami šį metodą, Karnou ir bendr. (žiūr.: Carnow et al.,- J.Neurochem., 1985, V.5, p.1965-1971) nustatė, kad suaugusios žiurkės sėdmeninio nervo aktyvus CNTF ir smegeninės kilmės aktyvus CNTF skiriasi dydžiu (24 kD) nuo viščiuko CNTF (20,4 kD).

Neseniai CNTF buvo klonuotas ir sintezuotas bakterinėse ekspresinėse sistemose. Tai aprašyta JAV No 07/570 651 patentinėje paraiškoje, kurios antraštė "Cilijarinis neurotrofinis faktorius", kuri paduota Sendtnerio su bendr. 1990 metų rugpjūčio 20 dieną. Panaudojus rekombinantinius bandinius, buvo nustatyta, kad suaugusios žiurkės audiniuose šio faktoriaus (CNTF) irNR yra 1.2 kb dydžio. Taip pat buvo klonuotas žiurkės smegenų CNTF ir nustatyta, kad jis koduojamas irNR, turinčia 5'-netransliuojamą sritį (77 bp) ir atvirą nuskaitymo rėmelį (ORF) su 600 bp, be to ši irNR koduoja maždaug 200 a.r. baltymą, žiūr.: Stockly et al.,- Nature 1989, V.342, p.920-923. Taip pat buvo klonuotas žmogaus CNTF, be to buvo nustatyta ir koduojanti seka. Tai aprašyta paminėtoje anksčiau JAV patentinėje paraiškoje. Koduojančios duoto CNTF sekos išsilaikė

6

taip pat, kaip ir preparato iš žiurkės audinių sekos, kai tuo tarpu nekuoduojančiose sekose įvyko deleocijos.

Funkcinės oiliarinio neurotrofinio faktoriaus savybės

Sis faktorius (CNTF) turi eilę biologinių efektų. Kaip anksčiau minėta, CNTF buvo traktuojamas kaip aktyvumas, palaikantis aštuonių parų (E8) viščiuko embriono oiliarinio ganglijaus neuronų išgyvenimą, be to ganglijus buvo traktuojamas, kaip parasimpatinės nervų sistemos komponentas. Sekančiuose šaltiniuose yra aprašyta kitos biologinės preparatų, turinčių CNTF aktyvumą, savybės.

Saadatas ir bendr. (žiūr.: Saadat et al., - J.Cell Biol., V.108, p.1807-1816) nustatė, kad jų maksimaliai išgrynintas sėdmeninio žiurkės nervo CNTF preparatas sukelia kultūroje oholinerginę simpatinių žiurkės neuronų diferenciaciją. Be to, Hofmanas aptiko, kad CNTF, išskirto iš viščiuko akies, aktyvumas didina oholin-O-acetiltransferazės tinklainės monosluoksnėse kultūrose aktyvumo lygį, žiūr.: Hoffman, - J.Neurochem., 1988, V.51, p.109-113.

Chjuzas ir bendr. tyrė ląstelių populiaciją, esančią potencialiu biologinio glialinio (glial) aktyvumo šaltiniu, kultūrose, išskirtose iš perinatalinio (perinatal) optinio nervo ir žiurkės smegenų. Buvo pademonstruota, kad šios ląstelės-šaltiniai didina, pirmiausia, oligopeptidų, o antra, antro tipo astrocitų kiekį, žiūr.: Huges et al., - Nature 1988, V.335, p.70-73. Priimtinoje kultūros auginimo sąlygose oligodendrocitinė diferenciacija, matyt, vyksta tiesiog iš ląstelių, esančių oligodendrocitinio tipo astrocitų (antro tipo - O-2A) šaltiniais, tuo tarpu kai astrocitinei (antro tipo) diferenciacijai, matyt, reikia indukuojančio baltymo, analogiško arba identiško CNTF, žiūr.: Anderson, - Trends Neurosci., 1989, V.12, p.83-85.

Heimansas ir Unsikeris nustatė, kad viršutinio skysčio sluoksnio, kuri sudaro neuroblastomos ląstelių ekstraktai, ultracentrifugavimas pateikia efektus, analogiškus tiems, kurie siejasi su viščiuko akies arba žiurkės sėdmeninio nervo CNTF aktyvumu (žiūr.: Heymanns & Unsiker, - Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 1979, V.4, p.7758-7762.); tuo pačiu buvo gautos nuorodos dėl baltymo, analogiško, bet ne identiško CNTF (pagal molekulinę masę).

Analogišką CNTF aktyvumą įvairiuose žiurkės ir viščiuko audi-

niuose tyrė Ebendalis (žiūr.: Ebendal, - J. Neurosci. Res., 1987, V.17, p.19-24). Panašų aktyvumą jis stebėjo plačiame žiurkės, bet ne viščiuko audinių spektre. Buvo pažymėta, kad kepenų ląstelės, blužnies T-ląstelės ir žiurkės skydliaukės ląstelės charakterizuojamos žemais aktyvumo, padedančio išgyventi ciliarinio ganglijaus ląstelėms, lygiais. Tuo tarpu širdies, smegenų, skeletinių raumenu audiniai pasižymi didesniu minėta išgyvenimu skatinančiu aktyvumu. Remiantis stebėjimais, tarp išbandytų audinių aukščiausiu aktyvumu, panašiu į CNTF, pasireiškia žiurkės kepenų audiniai.

Kadangi anksčiau minėti tyrimai parodė, kad daugelis audinių ir ląstelių ekstraktų turi aktyvumus, padedančius išgyventi neuroninėms ląstelių populiacijoms, savo ruožtu teigiamai reaguojančioms į CNTF, t.y. turi aktyvumus, padedančius išgyventi aštuonių parų (E8) viščiuko embriono ciliarinio ganglijaus neuronams laboratorinėje audinių kultūrų bioanalizės sistemoje, todėl nurodytus aktyvumus negalima priskirti vieninteliam arba identiškam baltymui. Pavyzdžiui, parodyta, kad šeimai faktorių, padedančių augti fibroblastams, kai kurie atitinkami polipeptidai arba baltymai, esant vienintelei bioanalizei, pasižymi identišku biologiniu aktyvumu, žiūr.: Dionne et al., - EMBO J., 1990, V.9, p.2685-2692.

Pirmiausia buvo nustatyta, kad viščiuko akies STEA ir žiurkės sėdmeninio nervo neuronini specifiškumą tam tikru laipsniu atstoja neuroninių ląstelių populiacijos, reaguojančios į NGF. Nors CNTF ir buvo nustatytas tam tikras neuroninio aktyvumo persidengimas su NGF, charakteringiausi skirtumai tarp jų išryškėjo tiriant CNTF ir NGF vaidmenį besivystančių neuronų populiacijose, žiūr.: Skaper & Varon, - Brain Res., 1986, V.389, p.39-46.

Nežiūrint į skirtingus vaidmenis minėtų populiacijų vystymėsi, CNTF nuo NGF dar galima atskirti pagal molekulinę masę, izoelektrinio taško reikšmę, nesugebėjimą inaktyvuoti antikūnais, specifiskais NGF, o taip pat pagal CNTF sugebėjimą palaikyti CGF neuronų išgyvenimą laboratorinėmis sąlygomis, žiūr.: Barbin et al., - J. Neurochem. 1984, V.43, p.1468-1478. Linas ir bendr. pranešė apie tai, kad CNTF sekos nėra homologiškos baltymų, apie kuriuos kalbėta anksčiau, sekoms, žiūr.: Lin et al., - Science 1989, V.246, p.1023-1026.

Sendtneris ir bendr. patentinėje JAV No 07/570 651 paraiškoje, pavadintoje "Ciliarinis neurotrofinis faktorius" ir paduotoje

1990 rugpjūčio 20, pažymėjo, kad rekombinantinis CNTF padėjo išgyventi nugaros smegenų vidurinės ir pilvinės dalies neuronams, o be to šie autoriai nustatė, kad žiurkės sėdmeninio nervo išgrynintas CNTF stabdo judėjimo neuronų atmirimą žiurkės naujagimio pažeistame veido nervo (VII kaukolinio nervo) audinyje, žiūr.: Sendtner et al., - Nature 1990, V.345, p.440-441.

Augimo faktoriaus receptoriai

Per paskutinius keletą metų molekuliniame lygyje buvo charakterizuoti ir klonuoti įvairūs receptoriai, apsprendžiantys surišimą ir reaguojantys į baltyminius faktorius. Tai insulino, tromboцитų išskiriamo augimo faktoriaus, epiderminio augimo faktoriaus ir giminingų jam faktorių, fibroblastų išaugimo faktorių, o taip pat įvairūs interleukinų bei kraujodaros (hemopoezės) augimo faktorių receptoriai. Remiantis naujausiais duomenimis tam tikri receptoriai gali rīstis su priklausomų faktorių visuma, tuo tarpu kitais atvejais vienas ir tas pats faktorius gali veikti į priklausomų faktorių visumą, žiūr.: Lupu et al., - Science 1990, V.249, p.1552-1555; Dionne et al., - EMBO J., 1990, V.9, p.2685-2692; Miki et al., - Science, 1991, V.251, p.72-75. Daugeli baltyminius faktorių surišančių receptorių galima charakterizuoti kaip nelastelīnes grandis, atsakingas už specifinį faktoriaus surišimą, kaip transmembranines dalis, veikiančias patekimą per membraną, ir kaip vidulastelīnius domenų, kurie įjungiami į inicijavimo komandos priėmimo-perdavimo sistemą, jungiantis baltyminiam faktoriui su nelastelīne receptoriaus grandimi. Idomu tai, kad nors daugeli receptorių sudaro vienintelė polipeptidinė grandinė, kitiems receptoriams aiškiai reikia (mažiausiai) dviejų atskirų substruktūrų, savo faktoriaus, esant aukštam giminingumo laipsniui, surišimui ir funkcinės reakcijos po surišimo saveikai, žiūr.: Hempstead et al., - Science 1989, V.243, p.373-375; Hibi et al., - Cell 1990, V.63, p.1149-1157. Minėto receptoriaus nelastelīnės ir lastelīnės grandys neretai pasireiškia kaip bendri struktūriniai motyvai su atitinkamomis kitų receptorių dalimis. Tai leidžia nusakyti evoliucinę ir funkcinę priklausomybę tarp įvairių receptorių. Šie tarpusavio ryšiai dažnai gali būti pakankamai tolimi ir atspindėti tik pasikartojančių kai kurių bendrų domeninių struktūrų panaudo-

9

jimą. Pavyzdžiui, kai kurie receptoriai, surišantys nepriklausomus faktorius, gali panaudoti "imunoglobulininius" domenų savo nelastelinėse grandyse, tuo tarpu kiti receptoriai savo dalyse, surišančiose faktorius, panaudoja "citokin-receptorinius" domenų, žiūr.: Akira et al., - The FASEB J. 1990, V.4, p.2860-2867. Daugelis receptorių, kurie turi skirtingus nelastelinius, surišančius domenų (kurie tuo pačiu suriša skirtingus faktorius), turi giminingus intracitoplazminius domenų, koduojančius specifines tirozinui proteinkinazes, aktyvuojamas surišus faktorių, žiūr.: Ulrich & Schlessinger, - Cell, V.61, p.203-212. Mechanizmai, kurių pagalba faktoriaus surišimas "aktyvuoja" priėmimo-perdavimo komandos procesą, nėra pilnai aiškūs net tirozinkinazių receptoriaus atveju. Kitų receptorių atveju, kada vidulastelinis domenas koduoja domeną su nežinoma funkcija arba surišantis komponentas asocijuoja su antru taip pat nežinoma funkcija baltymu, priėmimo-perdavimo komandos aktyvavimas lieka dar labiau neaiškus, žiūr.: Hibi et al., - Cell 1990, V.63, p.1149-1157.

Išradimo esmė

Sis išradimas apima CNTF genų ir baltymų. Konkrečiau, jis remiasi žmogaus CNTF geno klonavimu ir charakterizavimu, o taip pat jo ekspresija COS ląstelėmis, į kurias jis buvo transfekuotas.

Sis išradimas nustato nukleotidinių rūgščių sekas, koduojančias CNTFR, o taip pat gaunamus iš jo fragmentus. Jis taip pat numato kaip gauti aukšto laipsnio išgrynintą CNTFR baltymą ir šio baltymo peptidinius fragmentus.

Remiantis vienu išradimo aspektu, CNTFR bandinius, turinčius nukleotidinę rūgštį, taip pat kaip ir bandinius su antikūnais, galima panaudoti molekulių, giminingų CNTFR, identifikavimui. Pavyzdžiui, šiuo išradimu numatoma kaip gauti molekules, kurios sudaro kompleksą su CNTFR ir dalyvauja jo funkcionavime. Remiantis kitu šio išradimo pavyzdžiu, galima gauti receptoriaus molekules, homologiškas arba pasižyminčias antigeniniu krosreaktyvumu su CNTFR, bet ne identišką jam. Šie konkretūs variantai pagrįsti tuo, kad CNTFR pasižymi homologija kitoms biologiškai giminingoms molekulėms, kur pats specifiškiausias yra IL-6 receptoriaus, be to apima ir PDGF ir CSF-1 receptoriai, prolaktininis receptoriaus, IL-2

10

ir IL-4 receptoriai, GM-CSF receptoriai, neštumo atvejui specifiškas alfa-1-beta-glikoproteinas, o taip pat karcinoembrioninis antigenas bei auglio markeris.

Siuo išradimu taip pat numatomos analizės sistemos, kuriomis aptinkamos CNTF aktyvumą turinčios ląstelės, pasižyminčios aukštu CNTFR išskyrimo lygiu ir ypač jautrios labai mažoms CNTF arba molekulių, analogiškų CNTF, koncentracijoms.

Be to šis išradimas, numato eksperimentines modeliuojančias sistemas fiziologiniam CNTF vaidmeniui tirti. Jos apima gyvūnų modelius, tokius kaip: (1) gyvulius, kuriuose cirkuliuoja CNTFR peptidai, surišimo su CNTF metu konkuruojantys su ląstelinio receptoriu ir išsekinantys CNTF; (2) gyvulius, imunizuotus CNTFR; (3) transgeninius gyvulius, turinčius aukštas CNTFR koncentracijas ir todėl superjautrius CNTF; (4) gyvulius, išvestus panaudojus embrioninių-kamieninių ląstelių, iš kurių genomo buvo ištrinti endogeninio CNTFR genai, technologiją (embrionio stem cell technology).

Remiantis kitais šio išradimo variantais, CNTFR bandinius galima panaudoti, identifikuojant ląsteles ir audinius, kurie normalioje arba pažeistoje būsenoje reaguoja į CNTF. Pavyzdžiui, pacientui, sergančiam ligomis dėl CNTF, gali pasireikšti CNTFR ekspresijos anomalijos.

Be to išradime minėtus genus ir baltymus galima panaudoti gydymo tikslams. Pavyzdžiui (bet neapribojant išradimo), galima panaudoti CNTFR cirkuliavimą CNTF koncentracijoms traumuotose centrinės nervų sistemos vietose išsekinti. Kita vertus, rekombinantinį CNTFR geną galima įterpti į audinius, pavyzdžiui, į pacientų, sergančių lateraline amiotrofine skleroze, judėjimo neuronų audinius. Tai galėtų padėti, kai yra padidęs jautrumas CNTF.

Piešinėlių aprašymai

1 pieš.

A) ekspresinio klonavimo schema, kurioje naudojama ligandų - "etikečių" surišimo strategija. B) analizė, su antrą kartą joduo-tais antikūnais, parodė, kad priešingai COS ląstelėms, į kurias buvo transfekuota pradinės kDNR biblioteka, daugelje COS ląstelių, paveiktų tokia DNR transfekcija, pasireiškė CNTF surišimo vietos po vieno "paningo" (panning) ciklo ("radioini autografa" gaudavo,

panaudojus 60 milimetrų kultivavimo lėkšteles su COS ląstelėmis, i kurias buvo vykdoma transfekcija; kiekvienas juodas taškas reiškia vieną COS ląstelę, patyrusią transfekciją ir rodančią CNTF surišimo vietą). C) ta pati analizė, kaip ir B) punkte, tik i COS ląstelės buvo transfektuota plazmidė, nekoduojanti CNTFR (neigiamas klonas), arba plazmidė, koduojanti CNTFR (teigiamas klonas). Parodyta tik maža kiekvienos kultivavimo lėkštelės turinio dalis. D) čia pateikti COS ląstelių (remiantis C punktu, su transfektais teigiamais arba neigiamais klonais) atrinkimo metodo aktyvuojamąja fluorescencija analizės rezultatai.

2 pieš.

kDNR, koduojančios CNTFR, nukleininų rūgščių seka (SEQ ID No:1) ir ją atitinkanti aminorūgščių seka (SEQ ID No:2).

3 pieš.

Žmogaus hCNTFR homologija su "imunoglobulininiu" domenu ir "citokin-receptoriniu" domenu. Skaičiai kairėje reiškia aminorūgščių skaičių, pradedant nuo pirmojo metionino. Ištiesuose rėmeliuose pažymėtos identiškos liekanos ir išlikę tarpai. Homologijos maksimalizavimui įvesti trūkiai. IL-6 reiškia interleukinas-6, CEA - karcinoembrioninis antigenas, PDGF - trombocitų išskiriamas augimo faktorius, CSF-1R - kolonijų augimą stimuliuojantis faktorius-1, alpha1 B-GP - alfa-1-beta-glikoproteinas, PRL - prolaktinas, EPO - eritropoetinas, IL-2 - interleukinas-2, IL-4 - interleukinas-4, GM-CSF - granulocitų makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius.

4 pieš.

Struktūriniai ryšiai tarp CNTFR ir kitų giminingų jam receptorių. Žmogaus IL-6 receptorius ir CNTFR turi imunoglobulininį domeną, sulietą su rišančio faktoriaus siūlomo domeno N-galu. Siūlomas baltymas, analogiškas gp130, parodytas asocijuotoje su CNTFR būsenoje (žiūr. tekstą). HuGRHR - žmogaus augimo hormono receptorius, RbPRLR - triušio prolaktino receptorius, MoEPOR - pelės eritropoetino receptorius, HuIL2Rβ - žmogaus interleukino-2 receptoriaus beta-grandinė, HuIL6R - žmogaus interleukino-6 receptorius, HuCNTFR (arba hCNTFR) - žmogaus oiliarinio neurotrofinio faktoriaus receptorius, C - cisteinas, X - nežinoma aminorūgštis, W - triptofanas, S - serinas, F - fenilalaninas.

5 pieš.

12

CNTFR lokalizacija audiniuose. Ziurkės tiriamojo audinio RNR buvo gauta, remiantis 8.1. skyriaus aprašymu. Kaip aprašyta 8.1. skyriuje, CNTFR DNR fragmentai buvo gauti iš ekspresinių darinių, turinčių duotus genus pCMX plazmidėje. Audinių žymėjimai: CB – smegenėlės, HB – pakaušio dalies smegenys, MB – vidurinės dalies smegenys, TH/HYR – taliamusas, STRI – dryžuotasis kūnas, HIP B – hipokampusas B, HIP A – hipokampusas, CORT – galvos smegenų žievė, OLF – uodžiamasis stormuo, AD BR – suaugusio individo smegenys, SK – oda, HRT – širdis, MUS – raumenys, LUNG – plaučiai, INT – žarnynas, KID – inkstai, LIV – kepenys, SPL – blužnis, THY – tymusas (thymus), E17 LIV – 17 parų embriono kepenys.

6 pieš.

pCMX su žmogaus CNTFR geno intarpu. pCMX sandara yra paraiškos priede.

7 pieš.

CNTFR ekspresijos skeleto raumenyse Northern-blot analizė. Kiekvienu takeliu buvo leista po 10 µg bendro RNR kiekio. 1 takelis: pelės mioblastų ląstelių linija C2C12mb; 2 takelis: miovamzdelių (myotube) ląstelių linija C2C12mt; 3 takelis: pelės miovamzdelių ląstelių linija H9C2mt; 4 takelis: pelės miovamzdelių ląstelių linija L6mt; 5 takelis: pelės raumuo (soleus); 6 takelis: pelės pirštų atpalaidavimo raumuo (extensor digitorum longus, EDL); 7 takelis: skeleto raumuo su atjungtu nervu; 8 takelis: išgryninti žmogaus miovamzdeliai; 9 takelis: skeleto raumuo (duotas RNR bandinys nekondioiškas); 10 takelis: suaugusios pelės smegenėlės; 11 takelis: imituojantis darba raumuo (soleus); 12 takelis: pelės raumuo (soleus), kuriam 72 valandas atjungtas nervas; 13 takelis: imituojantis darba raumuo (EDL); 14 takelis: raumuo (EDL), kuriam 72 valandas atjungtas nervas.

8 pieš.

Dešinės užpakalinės galūnės, kurioje chirurgiškai atjungtas nervas nuo raumens, anatominė schema.

9 pieš.

UNOP – 1 grupės gyvulių (4 lentelė) nederbandys raumenys (soleus); užtušuoti stulpeliai atitinka dešinę pusę, užstričiuoti – kairę pusę; NONE – pažeistas (dešinė pusė su atjungtu nervu) ir kontrolinis (kairė pusė imituojanti darba) raumuo (soleus) be kokios nors injekcijos; iš 2 grupės gyvulių; ALB – pažeistas

13

(dešinys) ir kontrolinis (kairys) raumuo (soleus), paveikti PBS/BSA (SC); iš 6 grupės gyvulių; CNTF - pažeistas (dešinys) ir kontrolinis (kairys) raumuo (soleus), apdirbtas CNTF/BSA (SC); iš 5 grupės gyvulių. Užtušuoti stulpeliai - pažeisti raumenys, už-
štrichuoti stulpeliai - kontroliniai raumenys.

Tam kad išradimo aprašymas būtų aiškus ir detalus, jis suskirstytas į:

- (1) CNTFR klonavimas;
- (2) CNTFR koduojanti nukleininė rūgštis;
- (3) CNTFR peptidai;
- (4) CNTFR ekspresija;
- (5) CNTFR giminingų molekulių identifikavimas;
- (6) išradimo pritaikymo sritis.

Ciliarinio neurotrofinio faktoriaus receptoriaus klonavimas

Sio išradimo tikslas - klonuoti atitinkamo faktoriaus (CNTF) receptorių (CNTFR) ir po to atrinkti lasteles-taikinius, ekspresuojančias CNTFR. Numatant seką, koduojančią CNTFR, modifikavimo būdus, šiuo išradimu siekiama išgryninti CNTFR baltymą ir tiesiogiai klonuoti DNR, koduojančią CNTFR.

Pavyzdžiui, lasteles-taikinius (target cells), turinčias CNTFR, galima atrinkti (o CNTFR baltymą išgryninti), panaudojus metodus, gerai žinomus šios srities specialistams ir skirtus receptoriaus molekulėms išgryninti. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), pats CNTF arba CNTF, sudarantis kompleksą "CNTF-etiketė" (t.y. prijungta prie molekulės, kurią lengva aptikti, kaip tai aprašyta žemiau, 5.6.3. skyriuje, kur "etiketė" (tag, label) gali būti "radioinė etiketė", antigeninė determinantė, antikūnas ir daugelis kitų), gali būti grįžtamai surištas disulfidiniais tilteliais su lastelemis-taikiniais, be to baltymai, asocijuoti su minėtų lastelelių-taikinių membranomis, gali būti išgryninti tuo ar kitu metodu. Šie išgryninimo metodai gali remtis SDS-PAGE, kada aptinkamas CNTF arba gelyje susidaro kompleksas "CNTF-etiketė"; pavyzdžiui, imkime radioaktyvia etikete pažymėtą CNTF, kuris (surišta disulfidiniais ryšiais su savo receptoriumi) vizualizuojamas gelyje autoradiogra-

fijos pagalba. Kitu atveju, remiantis Western-blot metodika, galima panaudoti antikūną "anti-CNTF" arba "anti-etiketę" "CNTF-receptorius" komplekso tokiuose geluose vietai aptikti. Galima panaudoti elektroforeze gelyje, prieš išskiriant pakankamą kiekį baltymų, reikalingų receptoriaus peptidinių fragmentų aminorūgščių sekai nustatyti arba antikūno "anti-CNTF", kuris po to taikomas, norint gauti išgrynintas CNTFR molekules iš ląstelių-taikinių. Aminorūgščių seką, nustatytą išgrynintam CNTFR, toliau galima panaudoti, identifikuojant defektuos oligonukleotidų zondus, kurie vėliau naudojami klonuotos nukleininės rūgšties, koduojančios CNTFR, Oidentifikavime, projektuojant genominę DNR biblioteką arba, kas labiau pageidautina, kDNR biblioteką, sudarytą, panaudojus ląsteles-taikinius, gaminančias CNTFR.

Kita vertus, CNTFR galima klonuoti substraktyvinės hibridizacijos metodais, kuriais iRNR paruošiama iš CNTFR ekspresuojančių ląstelių-taikinių, po to sekas, nekoduojančias CNTFR, galima rasti hibridizuojant iRNR (arba gautą iš jos kDNR) su iRNR arba kDNR, gautomis iš ląstelių, pvz., neuroninių, kurioms nebūdinga CNTFR ekspresija. Nekoduojanti nukleininė rūgštis greičiausiai bus papildyta sekomis, koduojančiomis CNTFR.

Nukleininę rūgštį, paruoštą iš tikslinių ląstelių, papildytu sekomis, dėl endogeninės ekspresijos koduojančiomis CNTFR ir/arba nekoduojančiomis, kaip minėta anksčiau, taip pat galima panaudoti ekspresijos klonavimo technologijoje tiesioginiam CNTFR klonavimui. Pavyzdžiui (bet neapsiriboiant), galima paruošti ląstelių-taikinių bendragenominę DNR, charakterizuojamą CNTFR ekspresija, o po to transfekuoti į ląstelių liniją, kuriai nebūdinga CNTFR ekspresija ir kuri gauta iš biologinių rūšių, besiskiriančių nuo ląstelių-taikinių (pavyzdžiui, DNR iš ląstelės, koduojančios žmogaus CNTFR, galima pernešti į pelės audinių ląstelę, pavyzdžiui L-las-0

telę) donorų. Tokias ląsteles, kurios yra transfekuotos ir tik nedaugelis gali ekspresuoti CNTFR, galima identifikuoti "rozečių" arba imunofluorescencijos metodu (žiūr. 5.6.3.), be to šias ląsteles galima išskirti, pavyzdžiui, panaudojus aktyvuojamąją fluorescenciją, arba panaudojus magnetinius nešėjus su prijungtais antikūnais, arba "paningo" metodu (šios metodikos gerai žinomos esamos srities specialistams). DNR, koduojančią CNTFR, galima klonuo-

ti iš transfektantų, produkujančių receptorių, ir ,pasinaudojus jais (transfektantais), sukurti genomine biblioteka, po to išskirti ir padauginti klonus, kurie turi sekas, atitinkančias CNTFR aminorūgščių sekas, arba sekas, homologiškas biologinių rūšių specifiniams genetiniams elementams. Pavyzdžiui, žmogaus DNR galima identifikuoti pagal Alu pasikartojimo sekas, kurioms būdingas aukštas dažnumas visame žmogaus genome. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), galima paimti gyvulinės ląstelių kultūras, į kurias persodinta koduojanti CNTFR žmogaus DNR, ir padauginimui atrinkti tas ląsteles, kurioms būdinga žmogaus CNTFR ekspresija. Gautą iš tokių ląstelių genomine DNR galima transfekuoti į gyvulinės ląstelių kultūras ir atrinkti ląsteles, pasireiškiančias CNTFR ekspresija. Šį procesą galima kartoti; juo siekiama kiekviename etape didinti žmogaus DNR kiekį ląstelėse, koduojančiose CNTFR. Kuriant biblioteką, klonuojama ląstelių (su įvykusia transfekcija), ekspresuojančių žmogaus CNTFR, genomine DNR. Klonai, turintys žmogaus DNR (ir identifikuoti, pavyzdžiui, atrinkimo būdu, kuriuo nustatomi būdingi žmogui sekų elementai), turi didelę tikimybę atitikti sekoms, koduojančioms CNTFR (jei buvo pakartotos transfekcijos).

Ląstelių linijos arba pradinio audinio, kuriems būdinga CNTFR ekspresija, RNR arba ekspresinę kDNR biblioteką, gautą iš tokio šaltinio, apjungus (pulas) ir tiesiogine injekcija galima įvesti į *Xenopus* oocitus. Oocitus, su injekuotais pulais, koduojančiais CNTFR, galima identifikuoti, analizuojant funkcinės reakcijas (pavyzdžiui, jonų išmetimo), kurios apibrėžtos CNTF veikimu į tokius oocitus, arba, imant kitą variantą, juos galima identifikuoti, aptinkant CNTF surišimo vietas, esančias minėtų injekuotų oocitų paviršiuje. Kartojant teigiamą efektą duodančių pulų išskyrimą į vis mažesnius ir mažesnius pulus, galiausiai identifikuojami klonai, koduojantys CNTFR.

Kita vertus, ekspresinė kDNR biblioteka gali būti gauta iš ląstelių-taikinių, turinčių CNTFR, o po to panaudota pagreitintoms ekspresijos analizėms. Pagal siūlomą išradimo variantą nurodyta ekspresinė biblioteka gali turėti SV 40 replikacijos pradžią, todėl pagreitintas ekspresijos analizės galima atlikti, panaudojus COS ląsteles. Transfektantus, ekspresuojančius CNTFR, galima identifikuoti pagal ankstesnį aprašymą, be to DNR, koduojančią CNTFR, galima gauti standartiniais metodais. Nukleotidinę seką, kodujan-

šia CNTFR, po to galima padauginti ir/arba parinkti sąlygas ekspresinėse sistemose, panaudojus metodus, anksčiau jau charakterizuotus nukleotidinei rūgščiai, koduojančiai CNTFR; tai aprašyta patentinėje JAV paraiškoje No 07/570 651, paduotoje Sendtnerio ir bendr. 1990 metais rugpjūčio 20 ir pavadintoje "Ciliarinis neurotrofinis faktorius".

Pagal ypatingą išradimo variantą, aprašytą 6 skyriuje (žiūr. ir 1 pieš.), ekspresinį CNTFR klonavimą galima atlikti sekančiai: kDNR biblioteką galima paruošti iš ląstelių linijos arba audinio, ekspresuojančio CNTFR (pvz., SH-SY5Y), taip kad kDNR įsiterptų į ekspresijos vektorių. Po to minėtą biblioteką galima transfekuoti į tinkamą ląstelinę liniją, pavyzdžiui, į COS M5 ląsteles, remiantis DEAE/chlorokinine transfekcijos metodika. Po persodinimo, praėjus kelioms paroms, ląstelės paimamos iš kultivavimo lėkštelių ir veikiamos "paningo" metodu, kuri pasiūlė Sidas ir Aruffo, žiūr.: Seed & Aruffo- Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1987, V.84, p.3365-3369, ir kuris turi šiuos atvejus.

(1) Vietoj transfektuotų ląstelių inkubavimo su antireceptoriais antikūnais, šios ląstelės iš pradžių inkubuojamos ant ledo 30 min. su "etikete" pažymėtu CNTF (pvz., su CNTF-myo kompleksu) po to centrifuguojamos PBS buferio ir 2% Ficoll preparato mišinyje, tam kad būtų pašalintas ligando perteklius, ir galiausiai inkubuojamos ant ledo 30 min. su antižymėtu antikūnu, pavyzdžiui, su "anti-myo" antikūnu 9E10.

(2) Minėtos ląstelės leidžiamos per PBS buferio su 2% Ficoll preparato mišinį, o po to veikiamos antikūnais, kurių substancija padengtos lėkštelės, be to turima galvoje antikūnas "anti-etiketė", pavyzdžiui, kada "anti-etiketė" yra antikūnas 9E10 "anti-pele" (anti-mouse).

Vėliau, nuplovus nuo kultivavimo lėkštelių neprilipusias ląsteles, iš Hirto (Hirt) tirpalo, gauto atskyrus suspensiją prilipusių ląstelių preparate, galima, esant 10-20 µg tRNR, išsodinti plazmidinę DNR. Gautą plazmidinę DNR po to galima įvesti į tinkamas bakterijas, pavyzdžiui į DH10 B bakterijas, remiantis viena iš standartinių metodikų, įskaitant ir elektroporaciją (electroporation). Kultūros, išaugintos iš tokiu būdu transformuotų bakterijų, vėliau naudojamos plazmidinei DNR paruošti sekančiam eukariotinės transfekcijos ir "paningo" oiklui. Po tokio antro transfekcijos,

"paningo", plazmidinės DNR gavimo ir minėto transformavimo ciklo šias transformuotas bakterijas galima pasėti ant specialiai parinktos terpės kultivavimo lėkštelėse. Toliau atskiras kolonijas galima atrinkti ir panaudoti plazmidinei DNR gauti, be to DNR, paruoštą iš tokių klonų, galima panaudoti atskirai transfekcijai į OOS ląsteles. Kita vertus, prieš išbandant tas ar kitas atskiras kolonijas, gali prireikti papildomų amplifikacijos ciklų. Gaunamos OOS ląstelės, ekspresuojančios CNTF surišimo vietas. Šias ląsteles galima identifikuoti įvairiais metodais, pavyzdžiui, panaudojus netiesioginius surišimo analizės metodus (bet neapsiribojus jais), o būtent, panaudojus indikatorinius antikūnus su radioaktyviomis arba fluorescuojančiomis žymėmis. Nukleininės rūgšties, koduojančios CNTF, pavyzdys yra pCMX-hCNTFR (12) (6. pieš.), išsodinama kartu su NRRL ir žymima B-18789. Ši nukleininė rūgštis aprašyta tuo pačiu metu Deviso ir Jankopulo (Davis & Yankopoulos) pateiktoje JAV paraiškoje "Gyvūnų ekspresijos vektorius". Tokiu būdu identifikuotus klonus toliau galima analizuoti pagal restrikcinių fragmentų išsidėstymą ir, pasinaudojus standartiniais metodais, nukleotidinę seką. Po to DNR, koduojančios CNTFR, fragmentais galima identifikuoti genominės kDNR, turinčios CNTFR geną, sekas, pavyzdžiui, pasinaudojus standartiniu hibridizacijos metodu, genominės DNR bibliotekos sekas.

Vienąkart gautą CNTFR geną toliau galima klonuoti arba subklonuoti bet kuriuo metodu, kuris gerai žinomas šios srities specialistams. Galima panaudoti didelį šeimininko vektorių sistemų kiekį (vector-host systems). Galimi vektoriai – tai kosmidės, plazmidės arba modifikuoti virusai (bet neapsiribojama jais). Vektorinė sistema turi būti suderinta su naudojama ląstele-šeimininku. Nurodyti vektoriai yra bakteriofagai (λ -kilmės), o taip pat plazmidės, tokios kaip pBR322, pUC arba "Stratagene" firminiai plazmidiniai dariniai "Bluescript". Rekombinantines molekules į ląsteles-šeimininkus galima transformuoti, transfekuoti, infekuoti, elektroporuoti ir t.t.

CNTFR geną galima įterpti į klonavimo vektorių, kurį vėliau galima panaudoti tinkamų ląstelių-šeimininkų transformavimui, jų užkrėtimui arba transfekavimui, tam kad susidarytų daug žinomų genų sekų kopijų. Ši operacija vykdoma liguojant DNR fragmentą į klonavimo vektorių, turinti papildomas polilinkerines sekas. Vie-

18

nok, jei klonavimo vektoriuje nėra restrikcijos saitų, papildančių DNR fragmentą, tai DNR molekulių galai gali būti enzimatiškai modifikuojami. Siekiant palengvinti minėtą įterpimą į vektorius, gali būti naudingas restrikcijos saitų įjungimas į oligonukleotidinius praimerius, naudojamus polimerazinėje grandininėje reakcijoje (PCR). Kita vertus, bet kuri norima sėkla galima gauti liguojant linkerines sekas prie DNR galų. Šie linkeriai gali būti specialiai chemiškai sintezuoti oligonukleotidai, koduojantys sekas, atpažystamas restriktazių. Remiantis kita metodika, linijini vektoriu ir CNTFR geną galima modifikuoti homopolimeriniu susiuvimu.

Pagal atskirus išradimo variantus ląstelių-šeimininkų transformavimas su rekombinantinėmis DNR molekulėmis, kurios yra atskiras CNTFR genas, kDNR arba sintezuotos DNR sekos, užtikrina daugia kopijinių genų susidarymą; tokiu būdu, daug minėto geno kopijų galima gauti, auginant transformantus, atskiriant nuo jų rekombinantines DNR molekules, ir jei reikia, pakartotinai išskiriant įterptą geną iš izoliuotos rekombinantinės DNR.

Nukleininė rūgštis, koduojanti CNTFR

Pasinaudojus metodais, smulkiai aprašytais anksčiau, o taip pat 6 skyriaus pavyzdžiu (žiūr. žemiau), buvo nustatyta sekanti nukleininės rūgšties sėkla, iš kurios nustatyta ją atitinkanti aminorūgščių sėkla. Žmogaus sėkla pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:1). Pagal esamą išradimą galima panaudoti šią sėklą, jos funkcionuojanti ekvivalentą arba šios sekos fragmentus, iš kurių mažiausias yra 6 nukleotidai. Be to šis išradimas apima audinių genus, išskirtus iš kiaulių, karvių, avių, kačių, paukščių, arklių, žmonių, o taip pat primatų arba kitų biologinių rūšių, kurių organizmai turi CNTF aktyvumą. Fragmentai, esantys CNTFR sekos dalimis, sugeba hibridizuotis ir naudojami, pavyzdžiui, analizuojant nukleinių rūgščių hibridizacijos metodais: Southern-blot, Northern-blot ir pan.

Pavyzdžiui, nukleininės rūgšties sėklą, pavaizduotą 2 pieš. (SEQ ID No:1), galima keisti laškinėmis, insercinėmis arba delecijnėmis mutacijomis ir gauti sekas, koduojančias funkcionaliai ekvivalentiškas molekules. Pagal šį išradimą molekulė yra funkcionalus ekvivalentas molekulės, turinčios sėklą, pavaizduotą 2 pieš. (SEQ

19

ID No:2), arba sulyginama su ja pagal aktyvumą, jei sugeba surišti CNTF; vienok, surišant CNTF, jai visai nebūtinai homologiškas, lyginant su analogišku natūraliu CNTFR. Dėl koduojančių nukleotidinių sekų išsigimimo, šiame išradime galima panaudoti ir kitas DNR sekas, iš esmės koduojančias tą pačią aminorūgščių seką 2 pieš. (SEQ ID No:2). Tokios sekos apima (bet neapsiriboja) nukleotidines sekas, esančias pilnu arba daliniu CNTFR genu, pavaizduotu 2 pieš. (SEQ ID No:1) ir pertvarkytu, pakeitus įvairius kodonus, koduojančius funkcionaliai ekvivalentiškas aminorūgščių liekanas sekos ribose, tuo pačiu keičiant "tylejimą". Be to rekombinantines nukleotidines sekas, koduojančias CNTFR ir atitinkančias šį išradimą, galima sukonstruoti taip, kad būtų modifikuoti procesai, kuriuose dalyvauja arba ekspresuojasi CNTFR. Pavyzdžiui (bet neapsiriboja), CNTFR geną galima sujungti su promotorine (aktyvuojančia) seka ir/arba su ribosomų surišimo saitų, arba reguliacinė seka gali būti įterpta pasislinkusi į seką, koduojančių CNTFR, pradžią, paleidžianti CNTFR sekreciją ir, tuo pačiu, palengvinanti jo surinkimą arba bioprieinamumą.

Be to duotą CNTFR galima kultuoti laboratorinėmis sąlygomis (in vitro) arba gyvame organizme (in vivo), siekiant sukurti arba suardyti transliuojančias, inicijuojančias arba terminuojančias sekas arba siekiant sukurti koduojančių sričių ir/arba naujų restrikcinių saitų susidarymo arba anksčiau buvusių suardymo versijas, tam kad palengvinti tolesnę modifikaciją laboratorinėmis sąlygomis (in vitro). Šia galima naudoti bet kurį žinomą mutagenezės metodą, išskaitant (bet neapsiriboja) saitmutagenezę (site-directed) (žiūr.: Hutchinson et al. - J.Biol.Chem. 1978, V.253, p.6551); panaudojant firmos "Pharmacia" TAB markės linkerį ir pan.

CNTFR peptidai

Siame išradime taip pat pateikti CNTFR baltymai, jo fragmentai ir dariniai, turintys anksčiau minėtą aminorūgščių seką 2 pieš. (SEQ ID No:2), arba jų funkcionalūs ekvivalentai, o be to, baltymai, homologiški minėtiems baltymams, ir sudarančius mažiau- siai 30% šių homologų. Taip pat išradime pateikti fragmentai arba CNTFR baltymų dariniai, turintys mažiausiai po 6 aminorūgštis ir

20

esantys antigeninėmis determinantėmis arba funkcionaliai aktyviais junginiais. CNTFR baltymo su aminorūgščių seka, pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:2), molekulinė masė yra apie 42 kD.

CNTFR baltymai arba jų fragmentai ar dariniai yra (bet neapsiribojant) baltymai, turintys vietoj pirminės aminorūgščių sekos pilną arba dalinę aminorūgščių seką, iš esmės tą, kuri pavaizduota 2 pieš., įskaitant pakeistas sekas, kuriose funkcionaliai ekvivalentiškos aminorūgščių liekanos pakeistos kitomis, todėl keičiasi aktyvumas. Pavyzdžiui, viena ar daugiau aminorūgščių liekanų sekos ribose gali būti pakeistos kita aminorūgštimi, turinčia analogišką poliariškumą ir veikiančia kaip funkcionalus ekvivalentas, o tai jau aktyvumo pasikeitimas. Aminorūgšties pakaitalus galima parinkti tarp kitų tos klasės, kuriai priklauso ši aminorūgštis, atstovų. Pavyzdžiui, nepoliarinėms (hidrofobinėms) aminorūgštims priklauso alaninas, leucinas, izoleucinas, valinas, prolinas, fenilalaninas, triptofanas ir metioninas. Neutralaus poliariškumo aminorūgštims priklauso gliocinas, serinas, treoninas, cisteinas, tirozinas, asparginas ir glutaminas. Teigiamą krūvį turinčioms aminorūgštims priklauso aspargininė ir glutamininė rūgštys. Šio išradimo sričiai priklauso ir CNTFR baltymai, jų fragmentai arba dariniai, vienaip ar kitaip modifikuoti transliacijos metu arba po jos, pavyzdžiui, fosforilinant, glikozilinant, susidarant skersiniams ryšiams, acilinant, proteolitiškai skaldant, surišant su antikūno molekule, membranine molekule arba kitu ligandu, žiūr.: Ferguson et al.- Ann.Rev.Biochem., 1988, V.57, p.285-320.

CNTFR peptidus, atitinkančius šį išradimą, galima paruošti, pasinaudojus metodikomis, pagrįstomis rekombinantinės nukleinės rūgšties ekspresija arba cheminės peptidų sintezės pagalba.

CNTFR ekspresija

Siekiant rekombinantinio CNTFR ekspresijos, nukleotidinę seką, koduojančią CNTFR baltymą arba jo dalį, galima įterpti į tinkamą vektorių, turintį įterpiamos sekos, koduojančios baltymą, būtinus transkripcijos ir transliacijos elementus. Būtinai transkripcijos ir transliacijos signalai gali būti ir pačiame CNTFR gene ir/arba flankuojančiose jo dalyse. Sekos, koduojančios baltymą,

21

ekspresijai įvykdyti galima pasirinkti vektorių-šeiminiką iš sistemų eilės. Joms priklauso (bet neapsiribojant) gyvūnų audinių ląstelių, užkreštų virusais, tokiomis kaip vadinama virus, adenovirus ir pan. sistemos; vabzdžių audinių, užkreštų, pvz., baculovirus, sistemos; mikroorganizmai, tokie kaip mielės, turinčios mielių vektorius, arba bakterijos, transformuotos bakteriofago, plazmidės arba kosmidės DNR. Šių vektorių ekspresiniai elementai skiriasi stiprumu ir specifiškumu. Priklausomai nuo vektoriaus-šeimininko sistemos, galima pasinaudoti vienu iš tinkamų transkripcijos ir translacijos elementų.

Pagal ypatingai pagedautiną išradimo variantą, ONTFR genas gali būti ekspresijos vektoriaus (pCMX) pavidale, išsodinamoje su NRRL ir kitaip dar žymimą B-18790.

Bet kurio anksčiau aprašyto DNR fragmento įterpimo į vektorių metodu galima konstruoti ekspresijos vektorius, turinčius chimerinį geną, sudarytą iš transkripcinių-translacinių signalinių sekų, o taip pat iš baltymų koduojančių sekų. Tai rekombinantinės DNR arba sintezės laboratorinėmis sąlygomis (in vitro) metodai, o taip pat rekombinacijos gyvame organizme (in vivo), t.y. genetinės rekombinacijos. Nukleininės rūgšties sekos, koduojančios ONTFR baltymą arba peptidinį fragmentą, ekspresiją galima reguliuoti antra nukleininės rūgšties seka, tam kad ekspresuotusi ONTFR baltymas arba peptidas šeimininko ląstelėje, transformuotoje rekombinantine DNR. Pavyzdžiui, ONTFR ekspresiją galima valdyti promotoriniu-enhanceriniu elementu, žinomu šios srities specialistams. Promotoriams-enhanceriams, kuriuos galima naudoti ONTFR ekspresijos valdymui, priklauso (bet neapsiribojant): ankstyvoji enhancerinė SV 40 sritis (žiūr.: Bernois & Chambon - Nature, 1981, V.290, p.304-310), CMV promotorius-enhanceris, promotorius-enhanceris, esantis Rauso Sarkomos viruso galiniame pasikartojime (3 pakartojimai) (žiūr.: Yamamoto et al. - Cell, 1980, V.22, p.787-797), Herpes viruso timidinkinazinis promotorius-enhanceris (žiūr.: Wagner et al. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1981, V.78, p.1444-1445), melatonino geno reguliacinės sekos (žiūr.: Brinster et al. - Nature, 1982, V.296, p.39-42); prokariotiniai ekspresijos vektoriai, tokie kaip laktamazinis promotorius-enhanceris (žiūr.: Villa-Komaroff et al. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1978, V.75,

p.3727-3731) arba tas promotorius-enhanceris (žiūr.: De Boer et al. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1983, V.80, p.21-25); taip pat žiūr. straipsni "Naudingi baltymai, gauti iš rekombinantinių bakterijų", žurnale "Scientific American", 1980, V.242, p.74-94; mielių arba kitų grybų promotoriniai-enhanceriniai elementai, tokie kaip Gal 4 promotorius; alkoholdehidrogenazės promotorius ARC; fosfoglicerol-kinazės promotorius PGK; šarminės fosfatazės promotorius, o taip pat žemiau išvardintos transkripcijos valdymo gyvūnų ląstelėse, kuriose pasireiškia audinių specifiškumas ir yra panaudotos transgeniniuose organizmuose, sritys: elastazės I geno valdymo sritis, pasižyminti aktyvumu acinarinėse kasos ląstelėse (žiūr.: Swift et al. - Cell, 1984, V.38, p.639-646; Ornitz et al. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986, V.50, p.399-409; McDonald - Hepatology, 1987, V.7, p.425-515); insulino geno valdymo sritis, aktyvi kasos β -ląstelėse (žiūr.: Hanahan - Nature, 1985, V.315, p.115-122); imunoglobulino geno valdymo sritis, aktyvi limfoidinėse ląstelėse (žiūr.: Grosschedl et al. - Cell, 1984, V.38, p.647-658; Adames et al. - Nature, 1985, V.318, p.533-538; Alexander et al. - Mol.Cell.Biol., 1987, V.7, p.1436-1444); viruso valdymo sritis, sukianti pelės pieno liaukos vėžį, aktyvi krūtininkaulio (mast), testikuliarinėse ir limfoidinėse ląstelėse (žiūr.: Leder et al. - Cell, 1986, V.45, p.485-495); albumino geno valdymo sritis, aktyvi kepenyse (žiūr.: Pinkert et al. - Gene & Develop., 1987, V.1, p.268-276); α -fetoproteino geno valdymo sritis, aktyvi kepenyse (žiūr.: Krumlauf et al. - Mol.Cell.Biol., 1985, V.5, p.1639-1648; Hammer et al. - Science, 1987, V.235, p.53-58); α -I-antitripsino geno valdymo sritis, aktyvi kepenyse (žiūr.: Kelsey et al. - Genes & Devel., 1987, V.1, p.161-171); β -globulino geno valdymo sritis, aktyvi mieloidinėse ląstelėse (žiūr.: Mogram et al. - Nature, 1985, V.315, p.338-340; Kollias et al. - Cell, 1986, V.46, p.89-94); pagrinadinio mieloidinio baltymo geno valdymo sritis, aktyvi oligodendroцитinėse galvos smegenų ląstelėse (žiūr.: Readhead et al. - Cell, 1986, V.48, p.703-712); miozininės antros lengvosios grandinės geno valdymo sritis, aktyvi skeleto raumenyse (žiūr.: Sani - Nature, 1985, V.314, p.283-286); ir pagaliau, gonadotropina atpalaiduojančio hormono geno valdymo sritis, aktyvi hipotalame (žiūr.: Mason et al. - Science, 1986, V.234, p.1372-1378).

Ekspresijas vektorius, turinčius CNTFR geną, galima identifikuoti trimis pagrindiniais būdais:

- a) DNR-DNR hibridizacija;
- b) geno-markerio specifinių funkcijų buvimu arba nebuvimu;
- c) inseruotų sekų ekspresija.

Remiantis pirmu būdu, svetimą geną, inseruotą į ekspresijos vektorių, galima aplikti DNR-DNR hibridizacija, naudojant bandinius, kurių sekos homologiškos inseruotam CNTFR genui. Pagal antrą būdą, "rekombinantinis vektorius/šeimininkas" sistema galima identifikuoti ir parinkti sąlygas, remiantis geno-markerio specifinių funkcijų buvimu arba nebuvimu, pavyzdžiui, timidinkinaziniu aktyvumu, atsparumu antibiotikams ir pan., o būtent, funkcijų, paremtų svetimų genų įterpimu į vektorių. Pavyzdžiui, įterpus CNTFR geną į duoto vektoriaus geno-markerio seką, šios rekombinantus, turinčius CNTFR interpa, galima identifikuoti pagal geno-markerio funkcijos praradimą. Remiantis trečiu būdu, rekombinantinės ekspresijos vektorius galima identifikuoti analizuojant svetimo geno produktą. Tokia analizė gali būti paremta, pavyzdžiui, fizikinėmis arba funkcinėmis CNTFR geno produkto savybėmis, o būtent, receptoriaus susirišimu su CNTF arba antikūnu.

Pagal kitą variantą, į ląsteles, kuriose paprastai nepasireiškia CNTFR ekspresija, galima transfekuoti nukleininę rūgštį, koduojančią CNTFR, ir išbandyti, ar jos ekspresuoja funkcionalų CNTFR, veikiant transfektantus CNTF ir po to analizuojant cAMP kiekio padidėjimą.

Identifikavus ir išskyrus konkrečią rekombinantinę DNR molekulę, ją galima padauginti vienu iš daugelio metodų, žinomų šios srities specialistams. Pasirinkus tinkamą ląstelių-šeimininkų sistemą ir atitinkamas auginimo sąlygas, galima padauginti rekombinantinius ekspresijos vektorius. Kaip minėta anksčiau, tinkami ekspresijos vektoriai arba jų dariniai gali būti (bet neapsiribojant): žmogaus arba gyvūnų vektoriai, pavyzdžiui, vaocinia virus arba adenovirus; mielių vektoriai; bakteriofagų vektoriai (pvz., λ rūšies); plazmidiniai ir kosmidiniai DNR vektoriai ir pan.

Be to galima parinkti ląstelių-šeimininkų kamieną, keičianti įterptų sekų ekspresiją arba/ir geno produktą, suteikiant jam norimą struktūrą. Ekspresija, sukelta tam tikrais aktyvatoriais, ga-

lima sustiprinti tam tikrais stimulatoriais. Tuo būdu galima valdyti ONTFR baltymo, gauto genoinžineriniais metodais, ekspresiją. Įvairioms ląstelių-šeimininkų rūšims būdingi charakteringi specifiniai mechanizmai, kurių pagalba veikiami ir modifikuojami baltymai transliacijos metu ir po jos (pvz., glikozilinimas, skaldymas). Galima parinkti ląstelių linijas arba ląstelių-šeimininkų sistemas, suteikiančias ekspresuojamam svetimam baltymui norimą modifikavimą. Pavyzdžiui, ekspresijos metodą bakterinėje sistemoje galima panaudoti neglikozilinto šerdies baltymo gavimui. Ekspresija gyvūnų ląstelėse naudojama, norint gauti "savo" glikozilintą heterologinį ONTFR baltymą. Be to, įvairios ekspresuojančios "vektoriaus/ląstelė-šeimininkas" sistemos gali iššaukti reakcijas, tokias kaip įvairaus laipsnio proteolitinis skaldymas.

Identifikavus rekombinantą, kuriame ekspresuojasi ONTFR genas, būtina išanalizuoti geno produktą. Tai galima pasiekti analitiniais metodais, paremtais fizinėmis ir funkcinėmis produkto savybėmis.

Identifikavus ONTFR baltymą, jį galima išgryninti standartiniais metodais: chromatografija (pavyzdžiui, jonų mainų arba gel-filtracija), centrifugavimu, tirpumo skirtumais paremtu metodu ir keliais. Konkrečiai, ONTFR baltymą galima išskirti chromatografinėje imuninėje kolonėlėje su prikabinu ONTF. Šiame išradime pateiktos ir nukleininė rūgščių sekos, esančios komplementarios DNR arba RNR sekoms, koduojančioms ONTFR arba jo funkcionalią aktyviąją dalį. Atskiru atveju, galima sintezuoti antisensinius oligonukleotidus, komplementarius tam tikriems receptoriaus (ONTFR) irNR sąsams.

Molekulių, giminė su ONTFR, identifikavimas

Aprašyta daug "receptorius-faktoriaus" sistemų, kuriose vienas ir tas pats faktorius gali būti surištas su daugeliu receptorių (žiūr. anksčiau). Be to šiuo išradimu identifikuojami bet kurie papildomi ONTFR receptoriai, o schema tokia, kurią naudojo aprašyto šia ONTFR gavimui, išskyrus RNR šaltinį, naudojama ekspresinės kDNR bibliotekos sukūrimui. Šaltinį galima parinkti taip, kad jis išreikštų konkretaus ONTF receptoriaus ekspresiją, be to šaltinius

galima ivertinti CNTF-surišimu, kurio negalima priskirti CNTFR (palyginamajam baltymui, atsakingo už CNTF-surišimą ląstelių linijose arba audinio pavyzdžiuose su minėtu šia CNTF, nustatymui galima pritaikyti genetinius bandinius ir reagentus su antikūnais, gautais iš sekos, koduojančios CNTFR). Kadangi žinomi receptoriai, susirišantys su daugiau negu vienu giminigų faktoriu (žiūr. anksčiau), CNTFR identifikavimo metodika taip pat turi apimti ir bet kurio papildomo "savo" ligando, susirišančio su minėtu receptoriu, identifikavimą.

Kitas išradimo aspektas, kad CNTFR seką galima panaudoti molekulių, giminigų CNTFR, identifikavimui. Receptorius (CNTFR) turi elementus, giminigus su daugeliu kitų receptorių. Nelaštelinė CNTFR dalis turi "imunoglobulininį" domeną N-gale, taip pat ir "citokin-receptorinį" domeną, atskirtą nuo "imunoglobulininio" trumpa šarnyrine dalimi. Nors daugeliui receptorių būdingas homologiškumas "imunoglobulininiam" ir "citokin-receptoriniam" domenam, tik vienam, o būtent IL-6 receptoriui kartu su CNTFR, būdingas konkretus numatytų domenų išsidėstymas. Iš šia matyti, kad IL-6 receptoriaus baltymas giminigiausias CNTF receptoriui. Todėl, kad IL-6 receptorius panašus į CNTFR ir tuo, kad turi labai trumpą intracitoplazminį domeną, kuris, matyt, nereikalingas inicijuojamiems atsakams į IL-6 surišimą (žiūr.: Hibi et al. - Cell, 1990 V.63, p.1149-1157). Neseniai klonuotas naujas tarpininkas (pavadinotas gp130), perduodantis signalą IL-6 receptoriui. Pats jis nesuriša IL-6, bet padidina IL-6 receptoriaus surišimo giminigumą ir būtiną signalo perdavimą į IL-6 receptorių (žiūr. anksčiau Hibi et al.). CNTFR klonavimu parodoma, kad šis receptorius kartu su IL-6 receptoriu turi gana svarbias savybes, neaptiktas kituose žinomuose receptoriuose, ir tuo būdu atskleidžiama nauja receptorių šeima. Homologinius atitikimus tarp šių pirmų dviejų minėtų šeimos receptorių, kaip įrodė esamas išradimas, galima panaudoti papildomų giminigų receptorių identifikavimui, panaudojant DNR arba bandinius su antikūnais, atitinkančiais homologiškas sritys, arba vykdant grandininę reakcijų strategiją, dalyvaujant polimerazei kartu su išsigimusiais oligonukleotidais, atitinkančiais analogiškas aminorūgščių homologiškas sritys, žiūr.: Maisonpierre et al. - Science, 1990, V.247, p.1146-1151. Esamas išradimas pri-

taikomas ir eksperimentiškai nustatant, ar CNTFR naudoja tą patį signalo perdavimo tarpininką, kaip ir TI-6 receptorių, ar jis naudoja giminę molekulę. Pagaliau, receptorių, giminę CNTFR, identifikavimas praversta ir naujų ligandų, kurie rišasi su šiais receptoriais, identifikavime.

Pagal šį išradimą pasirinkta DNR biblioteka yra sudaryta iš genominės DNR, teikiant pirmenybę kDNR bei dalyvaujant oligonukleotidams, atitinkantiems CNTFR sekas, ir gautos pagal baltyminės sekos duomenis arba iš nukleininės rūgšties sekos, minėtos anksčiau ir pavaizduotos 2 pieš. (SEQ ID No:1). Minėtos DNR bibliotekos pagalba pavyksta identifikuoti klonus, koduojančius naujus anksčiau minėtos šeimos narius. Mažėjant selektyviosios hibridizacijos griežtumui, pavyksta identifikuoti šiek tiek neatitinkančius šeimos narius. Taip pat gali pasirodyti naudingas panaudojimas sekų, iš esmės primtinų minėtos šeimos nariams, kurių sekos nustatinėjamos. Konservatyvios sekos gali būti ypač naudingos, identifikuojant papildomus šeimos narius. Biblioteką galima parinkti, pasinaudojus, pavyzdžiui, hibridizacijos metodais, kuriuos pasiūlė Bentonas ir Devisas (žiūr.: Benton & Davis- Science, 1977, V.196, p.180) arba Grunšteinas ir Hognesas (žiūr.: Grunstein & Hogness- Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1975, V.72, p.3961-3965). Po to klonai, identifikuoti hibridizacijos metodu, analizuojami toliau ir analizės eigoje galima identifikuoti naujus šeimos narius, pasinaudojus restriktinių fragmentų kartiravimo metodais ir nustatant jiems sekas tokiais metodais, kurie gerai žinomi minėtos švieties specialistams.

Identifikuojant papildomus CNTFR superšeimos narius, gali būti naudingas grandininės reakcijos, dalyvaujant polimerazei, technologijos panaudojimas, žiūr.: Saiki et al.- Science, 1985, V.230, p.1350-1354. Pavyzdžiui, vykdant minėtą reakciją, galima naudoti jautrų ir nejautrų praimerius, atitinkančius žinomą CNTFR seką, teikiant pirmenybę kDNR kaip šablonui. Gali prireikti tokio šių praimerių projektavimo, kurio rezultatas būtų restriktinių fragmentų įjungimas, tai palengvintų minėtos reakcijos produktų įterpimą į tinkamus klonavimo vektorius. Grandininės reakcijos, dalyvaujant polimerazei, produktus galima įterpti į tinkamus vektorius, o gautus klonus po to galima išrūšiuoti, siekiant gauti nau-

jus šeimos narius. Tokį išrūšiovimą galima vykdyti standartiniais metodais, įskaitant hibridizacinę analizę su bandiniais, atitinkančiais žinomas sekas. Pavyzdžiui, esant žemam selektyvumui, galima hibridizuoti bandomines serijas, atitinkančias skirtingas CNTFR baltymo serijas, panaudojant kopijavimo filtrus, turinčius klonų DNR, kuri gauta vykdant grandininę reakciją su polimeraze (minėta anksčiau). Reikia paminėti, kad skirtingus klonus su vienais bandiniais galima hibridizuoti, o su kitais ne. Naujus šeimos narius taip pat galima identifikuoti, didinant hibridizacijos selektyvumą, kada nauji nariai, neidentiški bandiniams, gautiems iš žinomų narių, hibridizuotusi ne taip intensyviai, bet esant aukštesniam selektyvumui. Kita vertus, naujus šeimos narius galima identifikuoti restriktų kartiravimu arba standartiniais sekų analizės metodais, siekiant išaiškinti skirtumus restriktų žemėlapiuose arba sekose, palyginus su žinomais šeimos nariais.

Savo papildomuose atvejuose šis išradimas pateikia molekules, sudarančias kompleksą su CNTFR ir tuo padidina galinčias dalyvauti CNTFR funkcionavime. Pavyzdžiui, remiantis sekos analizės duomenimis, buvo nustatyta, kad visgi CNTFR neturi citoplazminio domeno. Tė tikroji, šis receptoriaus gali jungtis prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolą (GPI-ryšys, žiūr.: Ferguson et al. - Ann. Rev. Biochem., 1988, V.57, p.285-320). Tai leidžia teigti, kad mažiausiai viena kita molekulė, asocijuojanti su CNTFR, dalyvauja signalo perdavime ląstelės membrana. Tokia molekulė gali būti, pavyzdžiui, baltymas gp130, kuris asocijuoja su IL-6, žiūr.: Taga et al. - Cell, 1989, V.58, p.573-581. Tai ypač tikėtina esant homologijai tarp CNTFR ir IL-6 receptoriaus. Molekules, asocijuojančias su CNTFR ant ląstelės membranos, galima išskirti ir identifikuoti bet kuriuo žinomų metodu, įskaitant (bet neapsiribojant) skersinių cheminių ryšių susidarymą, išsodinimą antikūnų "anti-CNTFR" arba "CNTF-etiketė" ir/arba kitus baltymų arba skysčių gryninimo metodus.

Toliau, šiame išradime pateiktos molekulės, kurios skiriasi nuo CNTF ir gali risti su CNTFR. Tai molekulės, kurios konkuruoja su CNTF ir kitais normaliais ligandais ryšyje su CNTFR ir apima peptidus, peptidinius darinius ir peptidinius junginius.

Taradimo pritaikymas

Analizės sistemos

Siame išradime pasiūlytos analizės sistemos, kurių pagalba galima aptikti CNTF aktyvumą arba aktyvumus, analogiškus CNTF ir pasireiškiančius veikimu i peptidinius arba nepeptidinius junginius, matuojant fiziologinę reakciją i CNTF ląstelėje arba ląstelių linijoje, be to minėtos ląstelės charakterizuojamos CNTFR molekulių ekspresija. Fiziologinė reakcija gali būti bet kuris iš biologinių CNTF efektų, įskaitant (bet neapsiribojant) efektus, aprašytus 2 skyriuje, o taip pat apibrėžtų nukleotidinių rūgščių sekų (pavyzdžiui, elementų, esančių promotoriais-enhanceriais, ir struktūrinių genų) transkripcijos suaktyvinimą, CNTF modifikavimą, translaciiją arba fosforilinimą, antrinių procesų indukciją, kaip atsaką i tiesioginį ar netiesioginį CNTF veikimą, o be to morfologinius pokyčius, lokių kaip neuritinių abaugų susidarymas arba savybė išgyventi ląstelėms, lokioms kaip ciliarinio ganglijaus ląstelės, judėjimo neuronai, Purkinje ląstelės, hipotaliamo ląstelės ir pan.

Remiantis atskiru ir pranašesniu išradimo variantu, funkcinę tarpusavio sąveiką tarp CNTF ir CNTFR galima stebėti pagal vis didėjanti "iškart pasireiškiančių" pirminio reagavimo genų veikimą, kuriuos suaktyvina daugybė transmembraninių signalų, stimuliuojamų augimo faktoriais; šia priklauso (bet neapsiribojant) o-fos ir o-jun. Pavyzdžiui, "iškart pasireiškiančių" genų suaktyvinimą galima aplikti Northern-blot analizės metodu (lokių genų RNR kopijų kieki). Pagal išskirtinį išradimo variantą o-fos ir o-jun iRNR kiekį galima nustatyti, išanalizavus Northern-blot metodu iRNR, gautą iš likslinių ląstelių, inkubuotų esant CNTF, kada CNTF aktyvumas pasireiškia o-fos ir o-jun kiekio padidėjimu. Reikia pažymėti, kad pagal atskirus išradimo variantus, gavus ląsteles-laikinius, turinčias nukleotidines rūgštis, koduojančią rekombinantinį CNTFR, arba parinktas surišant su CNTF, gali prireikti garantijos, kad ląstelės-laikiniai charakteringai atiliktų CNTF arba junginiams, kurių aktyvumas analogiškas CNTF. Šio išradimo kontekste terminas "aktyvumas, analogiškas CNTF aktyvumui" įvestas norint

pažymėti biologinį aktyvumą, kuris panašus (nors gali būti, o gali ir nebūti identiškas) CNTF aktyvumui. Panašūs aktyvumai gali apimti (bet neapsiribojant) aktyvumus, aprašytus anksčiau 2.2. skyriuje, o taip pat iškart veikiančių konkrečių promotorių (enhancerių), tokių kaip fos ir jun, aktyvavimą.

Šis išradimas pateikia naujas analizės sistemas, kurias galima panaudoti atrenkant junginius pagal jų CNTF-aktyvumą ir aktyvumą, analogišką jam. Lasteles-taikinius, kurios rišasi su CNTF, galima gauti, transfekuojant į jas nukleininę rūgštį, koduojančią CNTFR, arba jas galima identifikuoti ir atskirti, pavyzdžiui, veikiant fluorescencija, rozečių sedimentacija arba riboto skiedimo metodu, aprašytu žemiau 5.6.3. skyriuje.

Gavus ir identifikavus tikslines ląstelių linijas, reikia atrinkti lasteles, ypač jautrias CNTF. Tokios ląstelės-taikiniai gali turėti didelį CNTFR molekulių kiekį. Šias lasteles-taikinius galima identifikuoti, pavyzdžiui, atrenkant lasteles, kurios, indukuotos sistemoje "CNTF-etiketė" ir imuno fluorescenciškai analizuotos, pasireiškia aukštesniu fluorescencijos intensyvumu. Kita vertus, ląstelės, ypač jautrios CNTF, gali reikšti aukštesnę biologinę reakciją, pavyzdžiui, žuolinis iškart reaguojančių genų (o-fos ir o-jun) produkto padidėjimas, kaip atsakas į CNTF surišimą. Remiantis analizės sistemomis su ląstelėmis-taikiniais, ypač jautriomis CNTF, šiame išradime numatomi atrinkimo metodai pagal CNTF-aktyvumą ir analogiškus jam aktyvumus, be to šiais metodais galima aptikti žemus CNTF aktyvumus.

Atskiru atveju, remiantis rekombinantinės DNR panaudojimo metodika, šiame išradime gaunamos ląstelės-taikiniai (CNTF atžvilgiu), kurios genų inžinerijos metodu pagalba pasižymi didesniu jautrumu CNTF. Pavyzdžiui, CNTFR geną, klonuotą minėtais anksčiau 5.1. skyriuje metodais, galima įterpti į lasteles, įgimtai reaguojančias į CNTF, todėl stebima didesnė rekombinantinio CNTFR geno ekspresija, o tokios genų inžinerijos būdu gaunamos ląstelės-taikiniai skiriasi didesne CNTFR molekulių savo paviršiuje ekspresija.

Priešingai minėtam atvejui (arba kaip papildymas), galima sukonstruoti lasteles-taikinius, turinčius rekombinantinį geną, pasižymintį aukštesnę ekspresijos lygį, reaguojant su CNTFR. Geriau,

jeigu lokių rekombinantinio geno prielaida – asociacija su lengvai aplinkamu produktu. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), iškart reaguojančio geno transkripcijos valdymo sritis (o būtent, promotorinės-enhancerinės sritis) galima panaudoti junginio, kuris įvedamas į ląsteles-taikinius, reporterinio geno ekspresijos valdyme. Jeigu junginys, turintis iškart reaguojantį geną derinyje su reporteriniu genu, charakterizuojamas aukšta ekspresija ląstelėse-taikiniuose (slipraus promotoriaus arba didelio kopijų kiekio dėka), tai junginį galima panaudoti atsakui į CNTFR surišimą sustiprinti. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), promotorių (enhancerių), reaguojanti į CNTF (pvz., α -fos arba α -jun), galima panaudoti aplinkamų reporterinių genų ekspresijos valdyme, įskaitant β -galiaktosidazės, augimo hormono, chloramfenikolacetiltransferazės, fosfoltransferazės, neomolino, timoiferazės arba β -glikoromidazės genus. Nurodant reporterinių genų produktų aplikimas gali būti farmacinių junginių jautriu CNTF aktyvumo (arba panašaus jam) indikatoriumi.

Aprašytus anksčiau junginius, koduojančius CNTFR arba turinčius reporterinį geną, galima įterpti į tikslines ląsteles bet kuriuo metodu, įskaitant (bet neapsiribojant) transfekciją, elektroporaciją, suderintus kalcio fosfato ir DEAE dekstrano metodus, ląstelinę patranką (cell gun), o taip pat išvedimą gyvūnų, esančių anksčiau minėtų junginių, kaip transgenų, nešėjais, be to iš šių gyvūnų audinių galima atrinkti ląsteles-taikinius (CNTF atžvilgiu) jau anksčiau minėtais metodais.

Sio išradimo analizės sistemos garantuoja efektyvų farmacinių junginių, naudingų susirgimams dėl CNTF gydyti, parinkimą. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), gali prireikti parinkti farmacinį agentą, pasižymintį CNTF-aktyvumu ir terapiniu efektu, esant smegenėlių audinių išsigimimui. Pagal atskirą išradimo variantą galima identifikuoti ir išskirti Purkinje ląsteles, reaguojančias į CNTF, o po to auginti kultivavimo ląstelėse mikroduobulėse. Esant atitinkamiems skiedimams, kultivavimo terpę, į kurią pridėtas bandomasis agentas arba CNTF, po to galima išdalinti po duobules, kartu su tinkama kontroline terpė. Po to ląsteles galima tirti stebint kaip pagerėja jų išgyvenimas, kaip vystosi atangos ir pan., be to galima nustatyti absoliučias ir santykinės bandomojo

agento ir CNTF aktyvumo reikšmės. Kitas pavyzdys parodė, kad judėjimo neuronų pažeistos vietos teigiamai reaguoja į CNTF, žiūr.: Sendtner et al. - Nature, 1990, V.345, p.440. Reiškia, šio atveju būtų naudinga identifikuoti junginius, panašius į CNTF ir galinčius stabdyti judėjimo neuronų atmirimą po akrotomijos. Judėjimo neuronus, reaguojančius į CNTF, galima naudoti analizės sistemose, identifikuojant junginius, naudingus judėjimo neuronų susirgimų gydyme. Tverlinius, kad CNTF efektyviai stabdo judėjimo neuronų atmirimą po akrotomijos (tai ypač svarbus atradimas, renkant gydymo metodus, kai pažeistos stuburo smegenys, esant amiotrofiniai lateraliinei sklerozei ir diabetinei neuropatijai, o būtent projektuojant vaistus, kurie galėtų būti efektyvūs, gydant minėtus susirgimus, įskaitant vaistus, kurių pririnktų galvos smegenų kraujiniam barjerui įveikti), yra svarbu turėti palikimą ir jautrią atrinkimo sistemą, kuri remtųsi šio išradimo principais. Kitame pavyzdyje nustatyla, kad konkrečiame susirgime pasireiškia nebeisinga konkretaus audinio reakcija į CNTF, ir racionalus minėto susirgimo gydymas galėtų būti CNTF injekcija pacientui. Vienok, gali pasirodyti naudingos ir lokios molekulės, kurios, palyginus su injekuojamu CNTF, turi ilgesnį skilimo pusperiodį arba veikia kaip CNTF žadin-tojai, arba nukreiptos į konkretų audinį. Todėl šio išradimo metodai taikytini efektyvoms ir jautrioms atrinkimo sistemoms, kurias galima naudoti identifikuojant molekules su norimomis savybėmis, sukurti. Analogiškas analizės sistemas galima naudoti CNTF antagonistams identifikuoti.

Eksperimentinės modelinės sistemos

Šiame išradime pateiktos ir eksperimentinės sistemos, skirtos fiziologiniam CNTF vaidmeniui tirti. Šiose sistemose CNTF baltymas, peptidinis fragmentas arba dariniai gali būti injekuoti arba gauti padioje sistemoje. Minėtas modelines sistemas galima naudoti tiriant CNTF pertekliaus efektus, o taip pat pasibaigus jo resur-sams. Eksperimentines modelines sistemas galima naudoti tiriant reakcijų efektus į CNTF susilpnėjimą arba sustiprėjimą ląstelių kultūrose arba audiniuose, visame gyvūno organizme, konkrečiose ląstelėse arba audiniuose, audinių kultūrų sistemose, o taip pat

22

ypatingu laiko intervalų metu (pavyzdžiui, embriogenezės), kada CNTFR ekspresija reguliuojama paleidžiamuoju arba nuosekliai reguliuojamu promotoriumi (enhanceriu). Atskiruose išradimo variantuose galima naudoti CMV promotorių (enhancerių) CNTFR ekspresijai transgeniniuose gyvūnuose valdyti. Naudojamas šis "transgeniniai gyvūnai" terminas priklauso gyviems transgeniniams gyvūnams, išskyrus žmogų, ir apima transgenines mozaikas, kada kai kurios arba visos organizmo ląstelės turi transgeną, be to gyviems organizmams priklauso bet kurios biologinės rūšys, išskyrus žmogų, ir šie organizmai gali būti įvesti bet kurio žinomo metodu, įskaitant (bet neapsiribojant) mikroinjekciją, ląstelių suliejimą, transfekciją, elektroporaciją ir pan. Pavyzdžiui, gyvūnai gali būti įvesti zigotų mikroinjekcijos metodu, žiūr.: Brinster et al. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, V.82, p.4438-4442.

Siame išradime pateiktos ir autoimuninio susirgimo modelinės sistemos, kada autoimuninis atsakas nukreiptas į CNTFR. Tokie modeliai - tai gyvūnai, imunizuoti imunogeniškais CNTFR kiekiais, be to geriau, jei nustatyta, kad organizme gaminasi specifiški CNTFR antikūnai (anti-CNTFR) ir/arba įgytas ląstelinis imunitetas. Norint sukurti tokią modelinę sistemą, gali būti naudinga CNTFR, kuris rišasi su imunostimuliatoriumi, priskyrimas tokiam kaip Bacille Calmette Guerin (BCG).

Padidinto CNTF aktyvumo modelinės sistemos

Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), galima sukurti eksperimentinę modelinę sistemą, skirtą pertekliniams CNTF aktyvumo efektams tirti. Tokioje sistemoje reakcija į CNTF galima sustiprinti genų inžinerijos metodu, padidinus CNTFR molekulių skaičių ant modelinės sistemos ląstelių paviršiaus, lyginant su ląstelėmis, neveikdomis genų inžinerijos metodais. Gali pasirodyti pranašesniu CNTFR molekulių skaičiaus didėjimas ant ląstelių paviršiaus, kurios paprastai ir pačios charakterizuojamos CNTFR molekulių ekspresija.

Siekiant padidinti CNTFR molekulių skaičių, ląsteles galima veikti genų inžinerijos metodais, pavyzdžiui, užkrečiant virusu, turinčiu CNTFR geną. Kita vertus, CNTFR geną galima transfekuoti į ląsteles.

Jeigu modelinė sistema yra gyvūno organizmas, tai rekombinan-

tinio CNTFR geną galima įvesti į organizmą, užkrečiant virusu, turinčiu CNTFR geną. Pagal kitą variantą, galima sukurti transgeninį gyvūno organizmą, turintį CNTFR geną transgeno pavidalu.

CNTFR ekspresijos garantijai būtina jo geną įstatyti už tinkamos prromotorinės (enhancerinės) sekos. Gali būti naudinga įstatyti CNTFR geną už konstitutyvaus ir/arba specialaus audininio promotoriaus (enhancerio), įskaitant (bet neapsiribojant) enolazę, specifiską CNS neuronui, nervinio audinio ir tirozino hidroksilazini, promotorių, metalotionini, paleidžiamąjį, promotorių, promotorių, kuris suaktyvinamas UV šviesa ir kuris yra HIV viruse (žiūr., Valey et al. - Nature, 1988, V.333, p.73-81), laipsniškai reguliuojamas promotoriaus.

Reakcija į endogeninį CNTF galima sustiprinti, padidinus ląstelių CNTFR molekulių kiekį. Jei modelinė sistema turi mažai CNTF arba išvis jo neturi, tai ji galima įvesti į sistemą. Gali būti naudingas papildomo CNTF įvedimas į modelinę tam, kad galėtume įvertinti perteklinio CNTF aktyvumo efektus. Kai dėl CNTF, esančio ekspresijos rezultatu (arba sekretuojamo CNTF), gali pasirodyti pranašesnis padidinto CNTF aktyvumo efektų tyrimo metodas ląstelėms, kurioms jau būdinga CNTFR ekspresija. Būtų dar geriau įvykdyti CNTFR ekspresiją visose ląstelėse (taip vadinama totaline ekspresija) ir vėliau nustatyti, kokioms ląstelėms būdinga funkcionali savybė reaguoti į CNTF, o tai leistų identifikuoti antrą receptorinį komponentą, jeigu toks egzistuoja.

Pažeminto CNTF aktyvumo modelinės sistemos

Kita vertus (bet neapsiribojant), yra galimybė sukurti eksperimentinę modelinę sistemą, kuri leistų tirti efektus, esant žemam CNTF aktyvumui. Tokia sistema galima identifikuoti procesus arba neuronus, kuriems reikia CNTF ir kurie ateityje galėtų būti gydymo objektais. Tokioje sistemoje galima susilpninti reakciją į CNTF, esant rekombinantinio CNTFR molekulėms, neasocijuotomis su ląstelių paviršiumi ir paveiktomis genų inžinerijos metodais tokiu būdu, kad būtų neefektyvios reakcijos į CNTF perdavimo mechanizme.

Pavyzdžiui, į sistemą galima įvesti baltymą, peptidą arba CNTFR darinį, tam kad jis papildytų endogeninį CNTFR, susirišant su CNTF, tuo sumažindamas reakcijos su CNTF galimybę. Receptorius

(CNTFR) gali būti laisvas (cell-free), kaip injekuojamas į sistemą, taip ir gaunamas pačioje sistemoje. Pavyzdžiui, CNTFR baltymo preparata, neturinti transmembraninio domeno, galima gauti iš ląstelių pačioje sistemoje, taip pat ir beinkarini CNTFR, kuris gali būti sekretuojamas iš ekspresuojančios ląstelės. Kita vertus, baltymą, peptidą arba CNTFR darinį galima injekuoti į tarpląstelinę ertmę, pačioje sistemoje.

Pagal papildomus išradimo variantus rekombinantini CNTFR geną galima panaudoti endogeninio geno inaktyvavimui, tai atliekama ir homologinės rekombinacijos būdu, todėl konstruojama ląstelė, audinys arba gyvas organizmas su CNTFR trūkumu. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), rekombinantinio CNTFR geną galima pertvarkyti genų inžinerijos metodais taip, kad jis turėtų įterptą mutaciją, pavyzdžiui, neo-geną, inaktyvuojantį CNTFR. Tokį darinį, esantį su tinkamu promotoriumi (enhanceriu), galima injekuoti į ląstelę, pavyzdžiui, į embriono stem ląstelę, panaudojant transfekciją, transdukciją, infekciją ir pan. Vėliau ląsteles, turinčias minėtą darinį, galima atrinkti pagal atsparumą G 418. Po to galima identifikuoti ląsteles be pažeisto CNTFR geno, pavyzdžiui, Southern ir Northern blotingais arba analizės ekspresijai metodais. Toliau, ląsteles be pažeisto CNTFR geno galima sulieti su ankstyvosios embriono vystymosi etadijos ląstelėmis ir lokiu būdu sukurti transgeninį gyvą organizmą su CNTFR defektu. Tokio gyvūno sulyginimas su gyvūnu, kuriame nepasireiškia endogeninio CNTF ekspresija, parodytų, kad šie du fenotipai pilnai atitinka vienas kitą ir kad juose nėra papildomų faktorių arba receptorių, analogiškų CNTF.

Tokį gyvą organizmą galima panaudoti, nustatant specifines neuronines populiacijas arba kitus procesus, pasireiškiančius gyvame organizme (in vivo) ir paprastai priklausančius nuo CNTF. Todėl tikėtina, kad šios populiacijos ir procesai pasireiškia, jeigu gyvūno organizmas skiriasi neekspresuojamu CNTFR ir todėl reaguoja į CNTFR.

Kita vertus, baltymas, peptidas arba rekombinantinio CNTFR darinys, kurie konkuruoja su endogeniniu CNTFR, gali sistemoje išreikšti ekspresiją ant ląstelių paviršiaus, bet tuo pačiu būtu sudaryti taip, kad nedalyvautų reakcijos į CNTF surišimą perdavimo mechanizme.

Aprašyti anksčiau baltymai, peptidai ir rekombinantinio CNTFR

dariniai gali risti su CNTF, esant giminigumo laipsniui, analogiškam CNTF ir CNTF arba besiskiriančiam nuo jo. Norint efektyviau susilpninti sugebėjimą reaguoti į CNTF, reikėtų, kad baltymas, peptidas arba CNTF darinys galėtų risti su CNTF, esant aukštesniam giminigumo laipsniui negu tas, kuri išreiškia "savas" receptorius.

Kai baltymas, peptidas arba CNTF darinys gaminasi pačioje modelinėje sistemoje, nukleininę rūgštį, koduojančią minėtus baltymus, galima įvesti į sistemą infekuojant virusą, transdukcijos, transfekcijos ir pan. metodais, o taip pat transgeno pavidalu. Kaip aprašyta anksčiau, CNTF geną galima įstatyti už tinkamo kontroliuojančio promotoriaus (enhanserio), paleidžiančiojo promotoriaus arba laipsniškai reguliuojamo promotoriaus.

Pagal atskirą išradimo variantą, ląstelės CNTF endogeninis genas gali būti veikiamas mutantiniu CNTF genu homologinės rekombinacijos būdu.

Pagal kitą išradimo variantą, CNTF ekspresiją galima sumažinti, esant ekspresuojančiose CNTF ląstelėse nedideliems DNR ir RNR kiekiams, mažinantiems CNTF jautrumą ir efektyviai žeminančiais CNTF baltymo ekspresiją.

Diagnostikos atvejai

Remiantis išradimu, CNTF bandinius galima naudoti identifikuojant ląsteles ir audinius, reaguojančius į CNTF normalioje ir ligotoje būsenose. Šiame išradime pateikti ląstelių, reaguojančių į CNTF aptikimą, identifikavimo būdai. CNTF ekspresiją galima išaiškinti pagal šio receptoriaus irRNR transkripciją arba pagal CNTF baltymo translaciiją. CNTF ekspresiją galima aptikti, panaudojus bandiniais, identifikuojančiais nukleininę rūgštį, arba CNTF baltymą.

Viena eilė bandinių, naudojamų CNTF ekspresijai aptikti, tai nukleininę rūgščių bandiniai, kuriuos galima naudoti CNTF koduojančios RNR aptikimui bet kuriuo žinomu metodu, įskaitant (bet neapsiribojant) hibridizaciją in situ, Northern-blot analizę arba PCR techniką.

Antra eilė bandinių, kuriuos taip pat galima panaudoti, tai etikelinto CNTF bandiniai; tai aprašyta patentinėje JAV paraiškoje

No 07/532 285.

Remiantis esamu išradimu, terminas "etiketintas CNTF" reikštų CNTF molekulę, pritvirtintą prie antro, lengvai aptinkamo, junginio ("etiketės"). Aptinkamu junginiu galėtų būti radioizotopas, fluorescuojanti molekulės dalis arba ligandas, galintis rištis su receptoriu, arba junginys, aptinkamas kolorimetriškai arba pasižymintis katalitiniu aktyvumu. Išskirtiniuose variantuose etikete galėtų būti antigeninė determinatė, pavyzdžiui, antikūnas, galintis rištis su etikete. Kitu atveju pati etiketė gali būti antikūnas: viename išradimo variante etiketė yra antikūnas RP3-17. Būtu geriau, kad etiketė neįtakotų biologiniam CNTF aktyvumui ir kad jos aptikimo metodai labai netrukdytų, CNTF rišantis su receptoriu.

Etiketę prie CNTF prikabinti galima bet kuriuo žinomu metodu. Pirmenybė teikiama kovalentiniais ryšiais, vienok, kai kuriais atvejais reikia ir nekovalentinių jėgų (pavyzdžiui, jei etiketė - imunoglobulino molekulė).

Etiketė gali būti bet kokio molekulinio dydžio, tačiau aptinkama bei neburi įtakoti biologiniam CNTF aktyvumui. Jei etiketė yra antigeninė determinatė, tai reikėtų, kad ją sudarytų mažiausiai 5-15 aminorūgščių.

Iliustruojamas (bet neapsiribojant) išskirtinis šio išradimo metodas, kuriuo galima etiketinti CNTF, panaudojant "liekamąją" PCR reakciją, kada rekombinantinis CNTF sukonstruotas taip, kad savo C-gale turi dešimt aminorūgščių, atitinkančių žinomą antigeninę determinatę. Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), ši antigeninė determinatė gali atitikti tam tikrą žmogaus c-myo protoonkogeninio baltymo epitopą.

Pavyzdžiui (bet neapsiribojant), "liekamosios" PCR metodu galima pritvirtinti etiketę su dešimčia myo aminorūgščių (manoma, kad šiuo būdu galima pritvirtinti bet kurią aminorūgščių etiketę). PCR 5'-primeris, atitinkanti CNTF seką, pasislinkusią truputį arčiau į pradžią, palyginus su charakteringa dalimi, kuri yra kerpa ma restriktazės bakterinėje sistemoje, galima naudoti PCR reakcijoje kartu su "liekamuoju" primeriu, kurio nukleotidų seka atitinka CNTF 3'-galo seką ir seką, koduojančią peptidinę etiketę, kai šablonu naudojama kDNR iš ląstelių, reaguojančių į CNTF.

PCR reakcijoje taip pat turi dalyvauti 3'-primeris, atitin-

kantis "liekamojo" praimerio seką ir apimantis nukleotidinę seką, kurioje yra restriktazės kirpimo saitai. Išskirtiniuose variantuose gali būti 5'- ir 3'-praimerių perteklius, lyginant su "liekamoju" praimeriu, o PCR reakcija tarp 5'-praimerio ir "liekamojo" praimerio baigtusi po keleto šios reakcijos ciklų, tuo tarpu, priešingai, reakcija tarp 5'-praimerio ir 3'-praimerio prasidėtų bei tęstųsi iki pilnos "CNTF-etiketė" sekos ir didelės išėigos. "Liekamajai" technikai nereikia ilgų praimerių, kurių sintezė sudėtinga ir ilgalaikė. Kompleksini "CNTF-etiketė" produktą galima gelfiltruoti ir veikti restriktazėmis, kurios kerta saituose, išlatyčiuose produkto galuose, o po to subklonuoti į atitinkamus ekspresinio vektoriaus restriktokinius saitus. Pavyzdžiui, "CNTF-myo" etiketei gauti imami sekantys praimeriai: 5'-praimeris 5'GAC TCG AGT CGA CAT CGG AGG CTG ATG GGA TGCC 3' (SEQ ID No:3) ir liekamasis 3'-praimeris CTA AAG ACT CCT^{CCT}AGA CAT CGC CGG CGT ATCG 3' (SEQ ID No:4), be to šiuos pramerius galima imti tokiais santykiais: 100 ng 5'-praimerio, 100 ng 3'-praimerio ir 1 ng "liekamojo" praimerio. Smulkiau žiūrėti 6 skyriuje. Sistemos "CNTF-etiketė" ekspresiją galima atlikti remiantis rekombinantinio CNTF ekspresija; tai aprašyta minėtoje patentinėje JAV paraiškoje No 07/570 651, o taip pat paraiškoje PCT No WO91/04316, kuri publikuota 1990 metais balandžio 4 ir kurios autorius Sendtneris su bendr.

Siame išradime pasiūlyta etiketė, esanti imunoglobulinu arba jo dalimi, pavyzdžiui, antikūno molekulės fragmentas Fo, F(ab) arba F(ab₂). Etiketė turi susirišti su CNTF ir būti polikloniniu arba monokloniniu antikūnu.

Remiantis šiuo išradimu etiketintą CNTF galima inkubuoti kartu su ląstelėmis lokiomis sąlygomis, kuriomis CNTF rištųsi su jomis (prisitvirtintu prie jų). Dažniausiai tai galima pasiekti standartinėse kultivavimo sąlygose. Pavyzdžiui, išskirtiniame išradimo variante ląsteles galima inkubuoti su etiketintu CNTF 30 min. Jei etiketė - antikūno molekulė, tai geriau, kad iš pradžių CNTF susirištų su ląstelėmis, o po to nuplauti jas nuo nesusirišusio ligando ir įvesti etiketės junginį - antikūną "anti-CNTF".

Atskiruose išradimo atvejuose etiketintą CNTF ant ląstelių, reaguojančių į CNTF ir žemiau vadinamų ląstelėmis-taikiniais, galima atlikti taip vadinama rozetinė analizė, kada indikatorines

38

lasteles, galinčias rišti su etikete, inkubuoja kartu su lastelėmis, turinčiomis sistemą "CNTF-etiketė", taip kad šios indikatorinės lastelės susilieja su "CNTF-etiketė" kompleksais lastelių paviršiuje, be to surištos indikatorinės lastelės sudaro rozečių pavidalo klasterius aplink "CNTF-etiketė" sistemą turinčias lasteles. Šias rozeles galima pamatyti standartine mikroskopine technika, naudojama lastelėms kultivavimo lėkštelėse, arba atskirti lasteles, paverstas ir nepaverstas rozetėmis, pagal tanki centrifugavimu. Atskirame išskirtiniame išradimo variante lasteles-taikinius, pavyzdžiui, neuronines, galima surinkti kultivavimo lėkštelėse su daug (iki 60) duobelių, esant maždaug 200 lastelių duobutėje koncentracijoms ir panaudojant terpę, pvz., RPMI 1640, kurioje yra 10% veršiuko embriono serumo (FBS) ir 2 mM glutamino. Lastelės, išskirstytos po lėkštelės duobutes, inkubuojamos 16-24 val., 37°C drėgnoje aplinkoje su 5% anglies dvideginio, tam kad prisilvirtintų lastelės. Vėliau terpės ir lastelių kultūros likutis pašalinamas, o lastelės inkubuojamos 30 min. kambario temperatūroje kartu su etiketintu CNTF. Po to lastelės keliskart plaunamos fiziologiniu druskų tirpalu (PBS), turinčiu kalcio, magnio bei 1% jaudžio serumo albumino. Pašalinant nesurištą ligandą, 30 min. kambario temperatūroje inkubuojama su antikūniniu junginiu (koncentracija apie 10 µg/ml), atpažystančiu etiketės molekulę. Vėliau, tam kad pašalinti nesurištą antikūną, lastelės keliskart plaunamos fiziologiniu druskų tirpalu. Po to lastelės-taikiniai, turinčios "CNTF-etiketė" sistemą, surišta su antikūnu "anti-etiketė", inkubuojamos kambario temperatūroje 1 val. su 0.2% suspensija, kurioje yra rozetės sudarančios indikatorinės lastelės, kurios rišasi su antikūnais "anti-etiketė", pvz., indikatorinės lastelės, turinčios "triušis-(anti-pelė)" imunoglobuliną. Pagaliau, kultivavimo lėkštelės plaunamos FBS ir fazokontrastiniu mikroskopu tiriamos rozetės. Pavyzdžiui, jei antikūnas "anti-etiketė" gautas iš pelės, tai indikatorinės lasteles galima paruošti, padengiant eritrocitus, pavyzdžiui, žmogaus O(+) eritrocitus, antikūno junginiu "anti-(pelės imunoglobulinas)", gautu iš kitų biologinių rūšių gyvūnų. Indikatorinės lasteles galima paruošti, inkubuojant eritrocitus su antikūnu "anti-imunoglobulinas", kurio koncentracija didesnė negu 1 µg/ml, 0.01% $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ir atskiesto druskų tirpale pagal Albino ir bendr. pasiūlytą procedūrą (Albino et al. - J.Exp.Med., 1981,

V.154, p.1764-1778). Kitame variante galima pasinaudoti magnetiniu nešėjų metodu ir kitais šioje srityje žinomais metodais.

Remiantis kitais išradimo variantais, etiketintą CNTF ant ląstelių-taikinių paviršiaus galima aptikti, pasinaudojus imuno-fluorescentiniu metodu, kada molekulė, raguojanti su etikete, teikiant pirmenybę antikūnui, fluorescuoja pati arba koks nors kitas šalutinis junginys. Fluorescencija galima stebėti mikroskopu arba, pasinaudojus ląstelių atrinkimo technika, fluorescencijos itakoje atrinkti ląsteles, turinčias "CNTF-etiketę" sistemą. Atskirame ir išskirtiniame išradimo variante (imant pavyzdžiu), ląsteles-taikinius galima vėl suspenduoti analitiniame buferyje, kuriame yra perteklinė "CNTF-etiketė" koncentracija bei 0.05% natrio azido, 30 min. 4°C temperatūroje. Po to ląstelės triskart plaunamos analitiniame buferyje, kaskart centrifuguojant 800 aps/min, 5 min. Toliau ląstelės 30 min. 4°C inkubuojamos kartu su antikūno junginiu "anti-etiketė", kurio koncentracija apie 10 µg/ml, plaunamos, kaip minėta anksčiau, ir vėl inkubuojamos 30 min. 4°C kartu su biotininu anti-imunoglobulinu bei "streptavidin-Texas Red" kompleksu. Po to ląstelės plaunamos, vėl suspenduojamos dispersiniame tirpale, uždengiamos dangteliais ir tiriamos fluorescentine mikroskopija.

Siame išradime taip pat numatyti kitų tipų etikečių aptikimo metodai, pavyzdžiui, chromogeninių etikečių, katalitinių etikečių ir pan. Bet kurios konkrečios etiketės aptikimo metodai priklausys nuo etiketės sukeliama signalo sąlygų.

Dar vienas linkamas bandinys yra antikūnas "anti-CNTFR".

Remiantis šiuo išradimu, CNTFR baltymą, jo fragmentus ir darinius galima naudoti kaip imunogenus, generuojančius antikūnus "anti-CNTFR". Išsiviniams rekombinantiniams, palyginus didelių CNTFR baltymo kiekiu gaminimosi, metodus, pagrįstus CNTFR nukleotidų sekomis, atitinkančiomis minėtą išradimą, galima būtų išspręsti kiekybinę CNTFR problemą.

Siekiant padidinti imuninės reakcijos tikimybę (su "anti-CNTFR"), galima analizuoti CNTFR aminorūgščių seką ir identifikuoti tas molekules dalis, kurios itakoja padidintą imunogeniškumą. Pavyzdžiui, aminorūgščių seką galima analizuoti kompiuteriu ir identifikuoti paviršinius epitopus, gauti kompiuterines hidrofiliškumo diagramas, paviršiaus tikimybiškumą, tankstumą, antigeninį

rodikli, amfifilinę spiralę, amfifilinę išklotinę, o taip pat ant-
rinę CNTFR struktūrą. Kita vertus, pavyko sulyginti iš įvairių
biologinių rūšių išvestas CNTFR aminorūgščių sekas, be to buvo
identifikuotos palyginti nehomologiškos sritys: eilėje biologinių
rūšių šios sritys greičiausiai imunogeniškos.

Monokloninių antikūnų, nukreiptų į CNTFR, paruošime galima
naudoti bet kuriuos metodus, kuriais antikūnų molekulės gaminasi
nepertraukiamo augimo ląstelių linijų kultūroje. Pavyzdžiui, šiam
išradimui priklauso hibridominis metodas, kurį pirmasis atliko Ke-
leris ir Milšteinas, žiūr.: Kohler & Milstein- Nature, 1975,
V.256, p.495-497, o taip pat triominis metodas, t.y. hibridominis
metodas su žmogaus B-ląstelėmis, žiūr.: Kozbor et al.- Immunology
Today, 1983, V.4, p.72, taip pat ir EBV - hibridominis žmogaus mo-
nokloninių antikūnų metodas, žiūr. monografiją: Cole et al., Mono-
clonal antibodies and cancer therapy, -ed. Alan R. Ziss, Inc., p.77-
96) ir pan.

Terapentiniam gydymui skirti monokloniniai antikūnai galėtų
būti žmogaus monokloniniai antikūnai arba chimeriniai monokloni-
niai antikūnai iš žmogaus ir pelės (arba iš kitų biologinių rū-
šių). Žmogaus monokloninius antikūnus galima sukurti remiantis
įvairiais šioje srityje žinomais metodais, žiūr.: Tong et al.-
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1983, V.80, p.7308-7312; Kozbor et al.-
Immunology Today, 1983, V.4, p.72-79; Olsson et al.- Meth.
Enzymol., 1982, V.92, p.3-16. Galima sukonstruoti chimerinių
antikūnų molekules, turinčias pelės domoną (surišanti antigeną)
kartu su pastoviomis žmogaus sritimis, žiūr.: Morrison et al.-
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1984, V.81, p.6851; Takeda et al.- Natu-
re, 1985, V.314, p.452.

Antikūnų prieš CNTFR gaminimosi sąlygoms parinkti tinka įvai-
rios žinomos procedūros. Galima imunizuoti, injekuojant CNTFR bal-
tymą, jo fragmentą arba darinį į eilės gyvūnų-šeimininkų organiz-
mus, įskaitant (bet neapsiribojant) triušius, peles, žiurkes ir
pan. Priklausomai nuo biologinės šeimininko rūšies, imuninę reak-
ciją galima sustiprinti įvairiais adjuvantais: froindo preparatais
(pilnais ir nepilnais), mineraliniais geliais, pavyzdžiui, aliumi-
nio hidroksidu, paviršiaus aktyviomis medžiagomis, pavyzdžiui, li-
zoletioilinu, pluroniniais polioliiais, polianijonais, peptidais,
aliejinėmis emulsijomis: hemocianinais (keyhole limpet), dinitro-

41

fenoliu, o taip pat potencialiai žmogui priimtinais adjuvantais, tokiais kaip Bacille Calmette Guérin (BCG), pagaliau, mikroorganizmu *Cornebacterium parvum*.

Molekulinį antikūno kloną prieš CNTFR epitopą galima paruošti žinomais metodais. Konstruojant nukleotidų seką, koduojančią monokloninio antikūno molekulę arba jos dalį, surišančią antigeną, galima pasinaudoti rekombinantinės DNR metodika, žiūr.: Maniatis et al. - Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory; ed. Cold Spring Harbor, New York.

Antikūno molekulės galima išgryninti žinomais metodais, pavyzdžiui, imunoabsorbcija, imunine chromatografija, HPLC, o taip pat derinant jas.

Siame išradime numatomas ne tik antikūno molekulių, bet ir jo fragmentų pritaikymas. Antikūno fragmentai, turintys molekulės idiotipą, generuojami žinomais metodais. Pavyzdžiui, tokie fragmentai apima (bet neapsiriboja): F(ab) fragmentą, kurį galima gauti, veikiant antikūnų substanciją pepsinu; Fab fragmentus, kurie gaunami redukuojant F(ab) fragmento disulfidinius tiltelius; pagaliau, Fab fragmentus, kuriuos galima generuoti, veikiant antikūno molekulę papainu bei redukuojančiu agentu.

Minėtus bandinius galima naudoti eksperimentinėje praktikoje, identifikuojant ląsteles arba audinius, kurie anksčiau neekspresavo CNTFR. Be to šiuos metodus galima naudoti, identifikuojant CNTFR ekspresiją neatitinkančiuose norma audiniuose, pavyzdžiui, piktybinių auglių audiniuose. Papildomuose išradimo variantuose šie metodai gali būti diagnostškai taikomi, lyginant sveikų ir sergančių pacientų CNTFR ekspresiją ląstelėse, skysčiuose arba audiniuose. Terminui "skystis" priklauso bet kuris organizmo skystis, bet konkrečiai turima galvoje kraujas arba cerebralinis nugaros smegenų skystis. Paciento CNTFR ekspresijos skirtumas, lyginant su sveiku žmogumi, gali rodyti, kad susirgimas tiesiogiai ar netiesiogiai siejasi su CNTFR metabolizmu. Pavyzdžiui, CNTFR lygio padidėjimas galėtų reikšti, kad paciento liga priklauso nuo padidėjusio organizmo jautrumo normaliems CNTFR kiekiams, arba, priešingai, leidžia teigti, kad paciento CNTFR kiekiai tokie maži, jog receptorių skaičius padidėja dėl kompensacijos. Šias antologijas galima atskirti, veikiant pacientą CNTF. Jeigu savižanda blogėja, tai, matyt, jis kenčia nuo superjautrumo CNTF, jeigu taisyti, ma-

47

tyt, jam trūksta CNTF. Alitinkamai galima parinkti ir gydymo kursą, skiriant CNTF arba jo antagonistą. Ekspresijos skirtumus galima aptikti baltymų ir/arba RNR lygmenyje, pavyzdžiui, matuojant paciento CNTFR baltymo arba RNR kiekius ir lyginant juos su sveikų žmonių rodikliais.

Anksčiau minėtus bandinius galima naudoti, atsiirenkant tabletes, reaguojančias į CNTF, tam kad pritaikyti jas jau aprašylose analizės sistemose (žiūr.: patentinę JAV paraišką No 07/532 285) arba standartines tablečių parinkimo ir atrinkimo procedūrose.

Terapentinio laikymo sritys

Išradime pateikti metodai, kada pacientą, kenčiantį, pavyzdžiui neurologiniu, sutrikimu, gydo efektingu CNTFR baltymo, jo peptidinio fragmento arba darinio kiekiu. Gydymo metodai, apimantys pačio CNTFR, CNTFR stimuliatorių-žadintojų, CNTFR antagonistų (konkuruojančių su endogeniniu CNTF) arba antikūnų "anti-CNTFR" skyrimą, irgi priklauso esamam išradimui.

Esamas išradimas numato ir farmacines sudėtis, kuriose CNTFR baltymas, peptidinis fragmentas arba darinys kombinuojamas su tinkamu farmaciniu nešėju.

Teidžiamas tiek bendras, tiek lokalinis CNTFR baltymo, peptidinio fragmento arba darinio paskyrimas. Galima naudoti bet kurį tinkamą šiai sričiai paskyrimo būdą, įskaitant (bet neapsiribojant) injekcijas į veną, po apvalkalu, į arteriją, per nosies ir burnos ertmę, po oda, į pilvo ertmę, taip pat vietinę injekciją arba chirurginį įskiepijimą. Taip pat numatyti receptai, remiantis kuriais organizme reguliuojamai išsiskiria aktyvūs komponentai.

Aiškėjant mūsų supratimui apie neuroišsigimimą dėl neurotraumos, tikriausiai, paaiškes endogeninio CNTF trofinio efekto sumažėjimo nauda. Todėl gali pasirodyti naudinga, kad nervinės sistemos traumotose dalyse būtų CNTF antagonistai, įskaitant (bet neapsiribojant) nelastelinį (cell-free) CNTF, kuris ryšio su CNTF metu galėtų konkuruoti su endogeniniu lastelinio receptoriu. Siomis sąlygomis tikslingiau, kad į pažeistą vietą CNTF antagonistas patektų lokaliu keliu, negu bendru.

Priešingai, kai kuriais atvejais sveikatos būseną gali pagerinti nuo padidintos reakcijos į CNTF. Todėl tikslinga pacientui,

kenčiančiam nuo esamo sutrikimo, padidinti CNTF molekulių skaičių arba surišimo giminingumą. Tai galima pasiekti genų terapijos pagalba. Rekombinantinio CNTFR tinkamose ląstelėse išskirtinę ekspresiją galima pasiekti, panaudojus CNTFR genams valdomus specifinius audinių arba paleidžiamuosius promotorius (enhanserius) arba lokališkai užkrėtus nesidauginančiais virusais su rekombinantiniu CNTFR genu. Sergančios būsenos, kurios gali pagerėti dėl padidinto jautrumo CNTF, apima (bet neapsiriboja) judėjimo neuronų funkcinius sutrikimus, įskaitant amiotrofinę lateralinę sklerozę, Werdnig-Hoffman ligą, chronišką proksimalinių nugaros raumenų atrofiją, o taip pat liekamąjį poliomielitinį sindromą. Tokį gydymą galima taikyti, esant neurologiniams sutrikimams dėl diabeto, Parkinsono bei Algeimerio ligų atvejais.

Toliau, išradimas numato konkrečių tipų audinių ir ląstelių disfunkcijų gydymą, paskiriant CNTF, jei šie audiniai arba ląstelės ekspresuoja CNTFR. Ypatingame išradimo variante parodyta, kad CNTFR genas ekspresuojasi raumenų ląstelėse (žiūr. 8 skyrių) ir kad CNTF stabdo raumenų masės taip pat ir miofibrilinio baltymo mažėjimą, kuris siejasi su atrofija, esant atjungtam nervui gyvame organizme (in vivo), žiūr. 9 skyrių. Atitinkamai, esamas išradimas numato raumenų ląstelių disfunkcijų, o taip pat neuroraumeninio komplekso sutrikimų gydymo metodus, remiantis kuriais pacientui skiriama: (1) nukleininės rūgšties molekulės, kurių nukleotidų seka koduoja CNTFR, jo funkcionalią aktyvią dalį arba darinį, taip kad galėtų ekspresuotis; arba (2) CNTF faktorius, jo funkcionali aktyvi dalis arba darinys. Tokie sutrikimai apima (bet neapsiriboja) susirgimus, kurių fundamentalus patologinis požymis yra distrofinis raumenų pasikeitimas. Pavyzdžiui, tokia raumeninė atrofija gali būti nervo atsijungimo pasekmė, kai nervo traumos atveju prarandamas kontaktas tarp raumens ir jį valdančio nervo, taip pat esant metabolitiniam išsigimimui arba dėl uždegimo, pavyzdžiui, Guillian-Barre sindromo atveju, gali būti charakterizuota periferine neuropatija arba toksiko-ekologiniais, arba medikamentiniais nervų pažeidimais. Kitame išradimo variante raumeninė atrofija yra nervo atsijungimo pasekmė dėl judėjimo neuronų neuropatijos. Tokia judėjimo neuropatija apima (bet neapsiriboja) suaugusio organizmo neurojudėjimo disfunkcijas, įskaitant amiotrofinę lateralinę sklerozę (AIS), arba Gehring ligą, vaikų ir paauglių

nugaros raumenų atrofija, autoimuninę judėjimo neuropatiją su daugiafokaliniu kondukciniu bloku (multifocal conduction block). Kitame išradimo variante raumenų atrofija yra chroniškos neveiklos pasekmė. Ji gali atsirasti dėl ligotų būsenų, apimančių (bet neapsiribojant) paralyžių dėl sumušimo, nugaros smegenų kanalo pažeidimus, trauminius skeleto pažeidimus (lūžius, raiščių patempimus arba išnarinimus), o taip pat ilgą gulėjimą lovoje. Remiantis dar vienu išradimo variantu, raumenų atrofija yra metabolitinio streso arba mitybos nepakankamumo pasekmė, įskaitant (bet neapsiribojant) vėžinį išsekimą ir kitas chroniškas ligas, badavimą arba rabdomiolizę (rhabdomyolysis), endokrinines ligas, tokias kaip (bet neapsiribojant) skydliaukės susirgimus ir diabetus. Raumeninė atrofija taip pat gali būti apibrėžta raumenų distrofijos sindromu, įskaitant (bet neapsiribojant) Duchenne'o ir Becker'io distrofiją; mio-toninę, raiščių-menčių-pečių, Emery-Dreifuss, okulofaringealinę (oculopharyngeal) menčių-pečių, apimančią galūnes, distrofiją; igimtą distrofiją; o taip pat distrofiją, žinomą kaip paveldimą periferinę miopatiją. Kitame išradimo variante raumeninė atrofija apibrėžta igimta miopatija, apimančia (bet neapsiribojant) igimtą Benign'o hipotoniją, nugaros smegenų nemalinę (nemaline) miopatiją, o taip pat miotubulinę vidubranduolinę (centronuclear) miopatiją. Be to, nukleininės rūgštys, koduojančios CNTFR, o taip pat CNTF, jo aktyvūs fragmentai ir dariniai, gali būti naudingi gydant aštrias (toksines arba uždegimines) miopatijas. Miopatijos, vykstančios kaip uždegiminio raumeninio susirgimo pasekmė, apima (bet neapsiribojant) polimiozitą ir dermatomiozitą. Toksinės miopatijos gali pasireikšti, veikiant agentams: (bet neapsiribojant), amiodaronui, ohlorokinui, klofibratui, kolohioinui, doksorubicinui, etilo spiritui, hidroksichlorokinui, organofosfatams, periheksilinui ir vinkridtinui.

Remiantis kitu išradimo variantu, pacientus, kenčiančius nuo CNTFR pertekliaus, superjautrumo CNTF, CNTF pertekliaus ir pan., galima gydyti, paskiriant RNR arba oligodezoksিনukleotidus, kurie efektyviai mažina jautrumą CNTF ir atitinka sritis, koduojančias CNTFR geną, tuo pačiu mažindami CNTFR ekspresiją.

Pavyzdys: ekspresinis CNTFR klonavimas

Medžiagos ir metodai

Receptoriaus ekspresinės bibliotekos sudarymas

kDNR bibliotekai sudaryti naudotas ekspresijos vektorius pCMX (aprašytas JAV paraiškoje No 07/678 408, paduotoje 1991 metais kovo 28), esantis vektoriaus pCDM8 dariniu (žiūr. Cuga: Seed- Nature, 1987, V.329, p.840-842), o irNR šaltiniu imtos SH-SY5Y ląstelės, gautos iš dr. June Bidler.

"Panning" metodas

"Panning" metodas, kuriam parinko sąlygas Seed'as ir Aruffo (žiūr.: Seed & Aruffo- Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1987, V.84, p.3365-3369), buvo modifikuotas taip: vietoj ląstelių inkubavimo su antikūnais, atpažystančiais receptorių, jos inkubuojamos su "CNTF-myo" (1 µg/ml) sistema ledo vonioje 30 min., ligando pertekliui pašalinti leidžiamos per PBS ir 2% Ficoll preparato mišinį, ir po to inkubuojamos su antikūnu 9E10 (gautu iš organizacijos Onco-gen Science, Manhasset, USA) ledo vonioje 30 min. Toliau ląstelės dar kartą leidžiamos per minėtą mišinį ir vykdomas "paningas" kultivavimo lėkštelėse, padengtos pelės monokloninio antikūno "anti-myo" peptido substancija, gauta iš firmos Sigma. Lėkštelės buvo ruošiamos sekančiais. Bakteriologinės 60-milimetrų Falcon 1007 (arba ekvivalentios joms) tipo lėkštelės arba 10-centimetrų Fisher 8-757-12 tipo lėkštelės buvo padengtos monokloninio antikūno: "anti-myo" substancija, atskiesta iki 10 µg/ml 50 mM Tris-HCl pH 9.5 tirpalu. Kiekvienai 6-centimetrų lėkštelei padengti imta po 3 ml antikūno substancijos ir po 10 ml 10-centimetrų lėkštelei. Taip padengtas lėkšteles laikė 1.5 val., po to substanciją pernešdavo į antrą lėkštelę ir po 1.5 val. - į trečią lėkštelę. Lėkšteles tris-kart plaundavo 0.15 M NaCl tirpalu, po to inkubuodavo 3 ml veršiuko serumo albumine (BSA), kurio koncentracija 1 mg/ml fiziologiniame PBS tirpale. "Panningą" vykdė sekančiais. Ląsteles kultivavo 100-milimetrų lėkštelėse. Po to iš kiekvienos lėkštelės nusiurbdavo terpę ir pridėdavo po 2 ml PBS, 0.5 mM EDTA ir 0.02% azido tirpalo. Tokį mišinį inkubuodavo 37°C 30 min., tam kad surinktų ląsteles nuo lėkštelių. Ląstelių kultūrą energingai sumaišydavo trumpa pas-

tero pipete, surinkdavo ląsteles nuo kiekvienos lėkštelės į centrifuginį mėgintuvėlį ir sukdamo 4 min. 200g. Gautas ląsteles vėl suspenduodavo 0.5–1.0 ml PBS, EDTA, azido ir 5% veršiuko embriono serumo (FBS) mišinyje ir inkubuodavo su "CNTF-myc" sistema ledo vonioje 30 min. Po to idėdavo lygų tūrį PBS, EDTA ir azido mišinio, atsargiai suformuodavo viršutinį sluoksnį iš 3 ml PBS, EDTA, azido bei 2% Ficoll preparato ir centrifuguodavo 4 min. 200g, pasibaigus švelniai nusiurbdavo viršutinį skysčio sluoksnį. Toliau ląsteles 30 min. ledo vonioje inkubuodavo su antikūnu 9E10, po to leisdavo per PBS, EDTA, azido ir 2% Ficoll mišinį. Tokias ląsteles patalpindavo į 0.5 ml PBS, EDTA, azido ir 5% veršiuko embriono serumo (FBS) mišinį. Ląsteles kartu imdavo ne daugiau kaip iš dviejų 60-milimetrų lėkštelių vienai 60-milimetrų lėkštei, padengtai antikūno substancija, ir laikydavo kambario temperatūroje 1–3 val. Neprilipusias prie lėkštelės ląsteles pašalindavo, plaunant PBS ir 5% serumo mišiniu arba terpe (užtenka 2–3 plovimų po 3 ml).

Klonų, turinčių CNTFR gena, identifikavimas

Ekspresinės bibliotekos DNR plazmidė buvo transfekuota į COSM5 ląsteles (apie 250–500 ng kiekvienai 100-milimetrinei lėkštei; transfekuota dviejose lėkštelėse), pasinaudojus standartiniu DEAE ir chlorokino mišinio metodu. Praėjus dviem dienom po transfekcijos, ląsteles surinkdavo ir vykdėdavo "paningą" pagal modifikuotą Seed'o ir Aruffo metodą.

Nuplovus nuo lėkštelių neprilipusias ląsteles, ruošdavo viršutinio sluoksnio Hirto skysčius (žiūr.: Hirt- J.Mol.Biol., 1967, V.26, p.365–369) ir išsodindavo DNR plazmidę su 10–20 μg tRNR. Remiantis gamintojo instrukcija, susidariusią DNR įvesdavo į bakterijos DH10B (Eleotomax, BRL) organizmą elektroporacijos metodu. Išaugintas iš elektroporuotų bakterijų kultūras naudojo DNR plazmidei paruošti kitam transfekcijos ir "paningo" ciklui. Netiesiogiai analizuojant joduoto antikūno surišimą su surinktomis nuo lėkštelių COS ląstelėmis, kuriose yra transfekuota DNR plazmidė, aiškiai matomas žymus COS ląstelių, ekspresuojančių CNTFR, kiekis (duomenys pateikti 1B pieš.; analizės metodai žemiau). Įvykdžius minėtų transfektantų antrą ciklą "paningas-DNR plazmidės išskyrimas-elektroporacija", transformuotomis bakterijomis, susidariusio-

mis elektroporacijos metu, užsėtose lėkštelėse su ampicilinu. Vėliau atrinktos individualios bakterijų kolonijos. DNR plazmidę, gautą iš kiekvieno minėto klonų, transfekavo į COS ląsteles individualiai tolesniam tyrimui. 14-oje iš 15-kos ištirtų plazmidžių įvairūs analizės metodai, įskaitant žemiau aprašytus netiesioginę antikūno surišimo analizę, o taip pat aktyvuojamąją fluorescenciją ląstelių atrinkimo analizę, parodė CNTF surišimo vietas besiekspresuojančiose transfekčiuose COS ląstelėse.

Tiesioginė surišimo su ^{125}I -hCNTF kompleksu analizė

Į COS ląsteles transfekčiuota DNR plazmidė iš bibliotekos, praturtintos bibliotekos arba iš individualių klonų. Po 48 val. lerpė pakeičiama į 0.25 ml surišimo buferio tirpalą RPMT 1640, kuriame yra 10% FBS, 0.1% NaN_3 ir pats kompleksinis faktorius ^{125}I -hCNTF arba kartu su netikėtintu hCNTF. Inkubuojama 60 min. kambario temperatūroje. Po to tirpalas su ^{125}I -hCNTF pašalinamas, o ląstelės triskart po 1 ml plaunamos surišimo buferiu ir lizuojamos 0.25 ml 0.1 n NaOH. Lizatas perkeliamas į polistirolinį mėgintuvėlį (12x75 mm), patalpinta į gama-skaitlinuką. Nespecifinis surišimas nustatomas, pridėjus mažiausiai 100-kartinį netikėtinto hCNTF perteklių. Po paskutinio plovimo lėkštelės autoradiografuojamos.

Ląstelių atrinkimo metodas aktyvuojamąją fluorescenciją

Transfekčiuotos COS ląstelės nuosekliai inkubuojamos su "CNTF-myo" kompleksu, antikūnu 9E10 ir antikūnu "ožka-(anti-pele)" su FITC-etikele. Toliau, ląstelės surenkamos nuo lėkštelių ir analizuojamos aktyvuojamosios fluorescencijos ląstelių atrinkimo metodu. Transfekcijos rezultatai, panaudojus teigiamas ir neigiamas plazmides, atspindėti 1D pieš. COS ląstelės, transfekčiuotos plazmide ir pasižyminčios CNTFR ekspresija, pagal šį analizės metodą charakterizuojamos daugybe populiacijų, fluorescuojančių žymiai intensyviau.

hCNTF jodinimas

15 min. 20°C temperatūroje 10 μg hCNTF (560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 10 mM Na

fosfatiname tirpale, pH 7.4) jodino natrio jodidu NaJ^{125} (1 mKiuri) su 6 ng/ml laktoperoksidaze (Sigma). Po 15 min. reakcija staigiai stabdoma lygiu buferio tūriu: 0.1% BSA, 0.1 M NaJ, 0.1% oitochromo C, 0.3% OHAc, 0.05% fenolio raudonojo ir 0.02% NaN. Iš gauto tirpalo paimami lygūs bandiniai, išsodinto TCA baltymo radioaktyvumui paskaidinti. Likusi dalis leidžiama per Bio-Rad PD-10 kolonėlę, nulygsvarintą 0.05 M Na fosfato, 0.1 M NaCl, 0.5 mg/ml protamino sulfato ir 1 mg/ml BSA tirpalu. Apjungus gautas frakcijas, matuojamas išsodinto TCA baltymo radioaktyvumas.

CNTFR sekos gavimas

Seka buvo gaunama, pasinaudojus firmos US Biochemical rinkiniu dvigrandei DNR spiralei (didezoksi), panaudojant sekvenazę (pagal gamintojo instrukcijas).

Antikūno "ožka-(anti-pele)" su ^{125}T netiesioginė surišimo analizė

I COS ląstelės buvo persodinta DNR plazmidė iš bibliotekos, praturtintos bibliotekos arba individualių klonų. Praėjus 48 val., ląstelės nuosekliai inkubuojamos 30 min. ledo vonioje PBS buferyje, kuriame yra Ca, Mg ir 5% FBS, su:

- 1) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ "CNTF-myo" sistema;
- 2) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antikūnu 9E10;
- 3) 0.55–1.00 mKiuri/ml antikūnu "anti-pele" (GaM) kartu su ^{125}T .

Po kiekvieno etapo ląstelės plaunamos triskart po 5 min. PBS ir 5% FBS mišiniu.

Kiekvienam individualiam klonui bendra radioaktyvumo riba kiekybiškai nustatoma rankiniu gama-skaitliuku.

Rezultatai ir jų aptarimas

Apribota analizė (restriction analysis)

Esant apribotai analizei, 14 teigiamų klonų išsiskyrė į keturias klases:

- a) 12 = 17 (2 kb),

- 119
- b) 11 = 15 = 16 (2 kb),
 o) 14 = 18 = 19 = 111 = 114 = 115 (4 kb),
 d) 110 = 112 = 113 (1.6 kb),
 (13 klonų buvo neigiami).

Veikiant restriklaze Pst 1, kiekvienos klasės nariai pasižymėjo vienodu juostų vaizdu. Vėliau apribota analizė atskleidė, kad keturios klonų klasės dengė viena kitą, be to buvę duomenys apie sekas patvirtino, kad šios klasės charakterizuojamos persidengiančiomis 5'-galų sekomis. Kaip kuriozas, įrodyla, kad b) klasė skiriasi neteisingai orientuotu vektoriaus intarpu eukariotinio promotoriaus atžvilgiu. 1 lentelėje matyti, kad šie klonai nuo kitų skiriasi mažesne ekspresija. Transkripcija šiuose klonuose gali didėti nuo silpno paslėpto promotoriaus srities, esančios arčiau prie vektoriaus polilinkerio pradžios.

Transkripcija ir transliacija laboratorinėmis sąlygomis (in vitro)

Baltymų, koduojamų minėtomis keturiomis klonų klasėmis, charakterizavimui reikia, kad visi jie būtų transkribuojami nuo T7 promotoriaus 5' vektorinio polilinkerio srityje. Su transliacijos laboratorinėmis sąlygomis (in vitro) produktais buvo atlikta PAGE-SDS elektroforezė.

a) klasės atveju baltymas netransliuojamas, kadangi jis neteisingai orientuotas promotoriaus T7 atžvilgiu. Kitų trijų klasių atveju gauti vienodo dydžio baltymai (maždaug 42 kD), tai patvirtina, kad tos klasės koduoja vieną ir tą patį baltymą.

1 lentelė

Surišimo ^{125}I -GaM kompleksu klonuose su CNTFR kiekybinė charakteristika

Klonas	Skilimų skaičius per minutę
11	2000
12	8500
13	600
14	9000
15	2000
16	1600
17	6000
18	7500

50

19	7000
110	4500
111	7000
112	5000
113	8000
114	10000
115	8000
Neigiamas	500
Kontrolinis fonas	250

Surišimo su CNTF analizė

Neliesioginės surišimo "CNTF-myo" komplekso su antikūnu "anti-pele" 9E10 ir antikūnu ^{125}T -"ožka-(anti-pele)" analizės rezultatai pateikti 1B ir 1C pieš. bei 1 lentelėje. Kaip matyti 1B pieš., kairėje esančios lėkštelės turinys gaunamas, transfekuojant nepraturtintą biblioteką, tuo tarpu lėkštelė dešinėje - praturtintos bibliotekos, transfekuotos DNR plazmide, rezultatas, išsilaukęs po vieno paningo ciklo (panaudojus maždaug lokį pat DNR kiekį, kaip ir nepraturtintoje bibliotekoje). Matyti, kad juodu laškeliais daugiau dešinėje lėkštelėje, be to kiekvienas laškas atitinka vienintelę COS ląstelę, ekspresuojančią komplekso "CNTF-myo" surišimo vietą, aptinkamą radiografijos metodu.

Individualiems teigiamiems klonams, minėtiems 6.2.1. skyriuje, bendrą radioaktyvumą kiekybiškai nustatinėjo rankiniu gama-skaitliuku. 1 lentelėje pateikti lokios analizės individualių klonų 11-115 rezultatai rodo, kad 14 iš 15 klonų charakterizuojami CNTF surišimo vietų ekspresija, tai jau buvo nustatyta neliesiogine antikūno surišimo analize. Fragmentai, paimti iš lėkštelių su kai kuriais individualiais klonais, buvo papildomai autoradiografuoti kaip parodyta 1C pieš.

Antras neliesioginio surišimo įrodymas, kuris pateiktas 1D pieš., remiasi "CNTF-myo" panaudojimu, kuris po to veikiamas antikūno 9E10 substancija, antikūno "ožka-(anti-pele)", etiketinto FITC, substancija ir aktyvuojamosios fluorescencijos ląstelių atpikimo metodu.

Transfekuotos teigiamų klonų COS ląstelės rodė 100-kartinį CNTFR ekspresijos padidėjimą, palyginus su transfekuotu neigiamų klonų ląstelėmis.

Neliesioginiai surišimo, panaudojus "CNTF-myo", duomenys buvo patvirtinti tiesioginiu ^{125}T -CNTF surišimu (2 lentelė). Transfe-

41

kuolos COS ląstelės ekspresuoja receptorių, kuris specifiškai ri-
šasi su jodintu, o taip pat ir "CNTF-myo", ligandu, tai charakte-
ringa SH-SY5Y ląstelėms, iš kurių CNTFR buvo klonuotas. Palyginus
su SH-SY5Y ląstelėmis, kiekvienai transfekuiamai COS ląstelei pris-
kiriama 30 kartų daugiau receptorių.

2 lentelė

Jodinto CNTF surišimo analizė
(¹²⁵I-CNTF koncentracija 2.16 nM)

Charakteringas skilimų skaič. per min.	Suskaičiuoti skilimai per min. 1 ląst.	Charakteringas skilimų skaič. per min.	Suskaičiuoti skilimai per min. 1 ląst.
1412	2.17×10^{-2}	1284	4.28×10^{-3}

Pastabos.

Vienasluoksni surišimo analizė buvo atlikta kultivavimo lėkš-
telėse su 20 duobučių, kuriuose po 3×10^5 SH-SY5Y ląstelių arba po
 6.5×10^4 COS ląstelių. Charakteringa skilimų skaičių per min.
rasdavo, atimant minėto skaičiaus reikšmę kai yra 1000-kartinis
neetikelinto CNTF perteklius iš analogiškos reikšmės, esant minė-
toms koncentracijoms ir ¹²⁵I-CNTF. Netransfekiuotose ląstelėse spe-
cifinis surišimas neaptiktas.

Praėjus 48 val. po transfekcijos, COS ląstelės analizuotos
DEAE dekstrane, be to nustatyta, kad sėkmingai transfekiuota, kaip
taisyklė, 20-40% ląstelių. Taikant, kad transfekcija sėkmingai iš-
laikė 20% ląstelių, charakteringas skilimų skaičius per min. paro-
dė: kiekviena transfekiuota COS ląstelė pasireiškia 30 kartų inten-
syvesne ekspresija, negu SH-SY5Y ląstelė.

CNTFR seka ir homologija su kitais augimo faktorių
receptoriais

CNTFR turi motyvus, bendrus su eile kitų receptorių. Neląste-
linė CNTFR dalis savo N-gale turi tiek "imunoglobulininį" domeną,
tiek "citokin-receptorinį" domeną, atskirtą nuo pirmojo trumpa
šarnyrine sritimi. Nors daugelis receptorių pasižymi homologija
tiek "imunoglobulininiam", tiek "citokin-receptoriniam" domenams

(žiūr. 3 pieš.), tik vieno, o būtent IL-6 receptoriaus, šiu domenu išsidėstymas yra toks pat, kaip ir CNTFR (žiūr. 3 ir 4 pieš.). Reikėtų, kad IL-6 baltymas yra labiausiai giminingas CNTFR (žiūr. 4 pieš.). Idomu, kad IL-6 receptoriui turi analogiškai trumpą citoplazminį domeną, kuris, matyt, nenaudojamas prisijungiant su IL-6 sužadavimo reakcijoje (žiūr.: Hibi et al.). Neseniai buvo klonuotas naujas signalo tarpininkas-perdavėjas gp130 receptoriui IL-6. Jis patis nesijungia su IL-6, bet padidina prisijungimo su IL-6 giminingumo laipsnį ir būtinai signalo, atsižvelgiant į IL-6, perdavimą (žiūr.: Hibi et al.). CNTFR klonavimas atskleidė, kad šis ir IL-6 receptoriui turi svarbias ypatybes, kurios neaplinkamos kituose žinomose receptoriuose, ir tuo padidina charakterizuoja naują receptorių šeimą. Iš analogijų tarp IL-6 ir CNTFR galima teigti, kad CNTFR naudoja tą patį signalo tarpininką-perdavėją arba analogišką jam molekulę. Pagaliau, receptorių, giminingų CNTFR, identifikavimas turėtų padėti, identifikuojant naujus ligandus, kurie rįstusi su šiais receptoriais.

Pavyzdys: CNTFR lokalizacija audinyje

Medžiagos ir metodai

CNTF bandomojo paruošimas

Koduojančios hCNTFR brities klonavimas į ekspresijos vektoriu pCMX aprašytas patentinėje JAV paraiškoje "Mammalian Expression Vector", paduoloje kartu su šia. Galutinis ekspresijos vektorius pavaizduotas 6 pieš. Northern-blot analizės metodui buvo sintetizuotas ir panaudotas CNTFR sekos PCR bandinys (nuo 889 iki 1230 bazės liekanos).

RNR paruošimas ir Northern-blot analizės metodas

Buvo paruošti žiurkių Sprague-Dawley atrinktų audinių pjūviai, kurie iškart užšaldyti skystame azote. RNR bandiniai buvo išskirti, homogenizuojant audinius 3 M LiCl ir 6 M urea mėšinyje (žiūr.: Bothwell et al. - Methods of Cloning and Analysis of Eucaryotic Genes, Boston, MS, ed. Jones & Barlett, 1990). RNR molekulės (10 µg) frakcionuojamos elektroforezės metodu per kvadruplikacinis (quadruplicate) 1% agarozinius-formaldehidinius gelius

13

(žiūr. Bothwell et al.), po to kapiliariškai pernešamos ant nailoninių membranų "Magna Graf" (firma Mioron Separations Inc.) ir 10 kartų plaunama SSC tirpalu (pH 7). RNR molekulės prikabinamos skersiniais ryšiais prie membranos, ekspozuojant UV šviesoje ir nudojant "Stratalinker" markės linkerį (firma Stratagen Inc.), o po to hibridizuojamos 68°C su radioaktyviais etiketintais bandiniais buferyje: 0.5 M Na fosfato (pH 7), 1% BSA, firmos "Sigma Inc." V frakcija, 7% SDS, 1 mM EDTA (žiūr.: Mahmoudi et al.- Bio-techniques, 1989, V.7, p.331-333); o taip pat 100 µg/ml DNR iš akustiškai veiktos, denatūruotos lašišos spermos. Filtrairtiskart plaunami 68°C SSC su 0.1% SDS tirpalu ir autoradiografuojami nuo 1 paros iki 2 savaičių 70°C, nudojant vieną arba du "Ornex" markės (firma Du Pont) stiprintuvus, o taip pat "SAR-5" markės (firma Kodak) rentgeno plokštelės. Nudažius gelius etidžio bromidu, matyti, kad skirtinguose bandiniuose išryškėja ekvivalentiškai totalinės RNR kiekiai (žiūr.: Maisopiere et al.- Science, 1990, V.24, p.1446-1451).

Rezultatai

5 pieš. matyti, kad CNTFR irNR pavyko aptikti CNS audiniuose, sėdmeniniame nerve ir antinksčiuose (mažais kiekiais), o taip pat raumenyse. Tai reikštų, kad CNTF pasižymi ne tik neurotrofiniu, bet ir miotrofiniu aktyvumu ir galima paaiškinti tiek CNS, tiek raumenu kai kuriuos susirgimus, tokius kaip Duchenne'o raumeninė distrofija ir igimta miotoninė distrofija, kada pacientai kenčia mentaliniu pristabdymu. CNTFR ekspresija raumeniniame audinyje leidžia teigti, kad CNTF dalyvauja raumenu fiziologijoje. Tokiu būdu, veikdamas neuronus, CNTF papildomai ir svarbiai gali veikti raumenis, kaip miotrofinis agentas, arba, kita vertus, įtakoti raumenu vystymąsi ir diferenciaciją.

Pavyzdys: įrodymas, kad CNTFR su ląstelės paviršiumi
rišasi glikozilfosfalidilinozitoliniais (GPI) ryšiais
Medžiagos ir metodai

Ląstelės SH-SY5Y kultivuojamos 24 duobučių Falcon tipo kultivavimo lėkštelėse su RPMT, papildytu 10% neaktyviu FBS. Eksperimentuose, kuriuose iki surišant CNTF veikla lipaze (paliekant kontrolinius bandinius), lerpė pašalinama nusilubiant, o ląstelės dukart plaunamos PBS, kuriame yra Ca ir Mg, po to inkubuojamos 45 min. 37°C PBS (Ca, Mg) su (arba be) specifine fosfalidilinozitolui fosfolipaze PI-PLC (galutinė koncentracija 500 mU/ml), gauta iš firmos Boehringer Mannheim (kat. No 1143-069). Toliau ląstelės triskart plaunamos surišimo buferiu: PBS (Ca, Mg) ir 5% FBS. Po to 30 min. kambario temperatūroje inkubuojama su 250 µl surišimo buferiu, turinčiu jodintą CNTF (kono. apie 100 pM) ir esant 1000-kartiniam neelikelinto CNTF (arba be jo) pertekliui. Eksperimentuose, kuriuose jodintas CNTF būna surištas prieš veikiant fosfolipaze PI-PLC, ląstelės pirmiausia 45 min. 37°C inkubuojamos surišimo buferyje su jodintu CNTF, esant neelikelinto CNTF (arba be jo) pertekliui. Toliau ląstelės dukart plaunamos PBS (Ca, Mg) ir inkubuojamos 45 min. PBS (Ca, Mg), turinčiame arba ne fosfolipazę PI-PLC (galutinė kono. 500 mU/ml).

Rezultatai ir jų aptarimas

CNTRF seka parodė, kad koduojamo baltymo seka baigiasi hidrofobine dalimi, už kurios yra neocitoplazminiai domenai, neturintys nei "stop transfer" sekos, nei citoplazminio domeno. Tokia struktūra primena C-galų membraninių baltymų, pasižyminčių transmembraninių domenų trūkumu ir pritvirtintu prie ląstelės paviršiaus GPI ryšiais (žiūr. Ferguson & Williams, 1988). Todėl buvo atlikti eksperimentai, kuriais siekta nustatyti, ar tikrai CNTFR prie ląstelės rišasi per GPI. 3 lentelėje parodyta, kad, paveikus ląsteles SH-SY5Y fosfolipaze PI-PLC, jos daugiau nesuriša CNTF. Tai patvirtina tą faktą, kad CNTFR rišasi su ląstele per GPI. Vienok, CNTF, jau susirišusi su SH-SY5Y ląstelėmis, negalima negalima atpalaiduoti, veikiant fosfolipaze PI-PLC (žiūr. 3 lent.). Idomu pažymėti, kad tirpi IL-6 receptoriaus forma didelė tikimybė priklauso

antram membraniniam baltymui (gp 130), kuris būtinai signalui nuo IL-6 perduoti. Tokiu būdu, CNTFR atpalaidavimas sustabdomas, asocijuojant CNTF, jo receptorini ir tarpininkui (gp 130 arba jo analogui). Kita vertus, CNTF surišimas gali keisti CNTFR struktūrą, todėl jis tampa mažiau jautresnis fosfolipazei PT-PLC (kai kuriems GPT-ryšio baltymams būdingos formos, atsparios PT-PLC).

Svarbus yra tas faktas, kad CNTFR rišasi prie ląstelės paviršiaus per GPT. Tai pirmasis augimo faktoriaus pavyzdys, kuris didina tikimybę kitiems receptoriams rištis per GPT. Kai kurie baltymai turi abi formas: ryšio per GPT bei transmembraninius domenus. Nustatyti faktai rodo, kad CNTFR turi alternatyvius C-galus, galinčius koduoti transmembraninį domeną, o analogiškai IL-6 turi formą, galinčią rištis per GPT. Tos augimo faktorių receptorių formos, kurios rišasi per GPT, gali pasireikšti naujais receptorių reguliavimo ir atpalaidavimo mechanizmais. Pavyzdžiui, paviršinių receptorių, besirišančių per GPT, slopinimas gali greitai pasireikšti, atspalaiduojant receptoriams citoplazminių fosfolipazių poveikyje. Tokie atpalaiduoti receptoriai gali veikti į kitas ląsteles tiek savarankiškai, tiek surišimo būsenoje, panašiai kaip tirpus IL-6 receptorių pademonstravo tą patį, rišantis IL-6 su aktyvuotomis ląstelėmis, kurioms charakteringa gp 130 ekspresija.

Tikimybė, kad CNTFR atpalaidavimas, veikiant PT-PLC, blokuoja CNTF veikimą, gali būti linkamai pritaikyta. Šiais faktais galima patvirtinti, kad stebimi CNTF efektai apibrėžti klonuotu CNTFR. Terapentiškai fosfolipazę PT-PLC galima naudoti CNTFR atpalaidavimui ir, galbūt blokuojant CNTF poveikį, kai manoma, kad CNTF aktyvumas kenkia.

Jei CNTFR atpalaidavimas (veikiant PT-PLC), sugebančias blokuoti CNTF, apibrėžtas trigeno komplekso susidarymu tarp CNTF, jo receptoriaus bei signalo tarpininko-perdavėjo baltymo, tai šią receptoriaus ypatybę galima panaudoti, nustatant ir klonuojant tarpininko-perdavėjo molekulę.

3 lentelė

Fosfolipazės PI-PLC veikimo įtaka ribantis CNTF su ląstelėmis SH-SY5Y

	Radioaktyvių skilimų sk. per min.	
	Be pertekliaus C (old)	Su pertekliumi C (old)
Poveikis fosfolipaze PI-PLC	1440	370
be PI-PLC	420	310
su PI-PLC		
CNTF surišimas prieš veikiant PI-PLC		
be PI-PLC	1250	310
su PI-PLC	1060	300

CNTF poveikis skeleto raumenims, su atjungtu nervu gyvame pelės organizme (in vivo)

Cia aprašytų eksperimentų tikslas yra išsiaiškinti išgryninto rekombinantinio CNTF poveikį skeleto raumenims, su atjungtu nervu gyvame organizme (in vivo), ir nustatyti, ar gali CNTF sustabdyti kai kuriuos fenolipininius pokyčius, esant atrofijai, susietai su nervo atjungimu, ir pasireiškiančiai, pavyzdžiui, raumenų masės, o konkrečiai, miofibrilinio baltymo, praradimu. Autoriai nustatė CNTF ekspresiją tiek miovanzdeliuose, tiek skeleto raumenų mioblastuose, o taip pat, kad CNTF stabdo tiek raumenų masės, tiek miofibrilinio baltymo praradimą, esant atrofijai su atjungtu nervu.

CNTF ekspresija skeleto raumenų miovanzdeliuose ir mioblastuose

RNR bandiniai, paimti iš įvairių žiurkės audinių, analizuoti Northern-blot metodu, norint identifikuoti pirminius ląstelinius CNTF taikinius (5 pieš.). Bandinio, gauto iš koduojančios hCNTFR sritys, transkriptas yra apie 2 kb, kurio ekspresija, iš esmės, riboja CNS, išskyrus nelikėtai aukšlus kiekius skeleto raumenyse ir žemus – antinksčiuose bei sėdmeniniame nerve.

Detalesnė CNTFR analizė skeleto raumenyse atlikta, kaip minėta anksčiau, Northern-blot analizės metodu, panaudojus iRNR, gauta iš konkrečių pelės raumenų rūšių, iš išskirtų žmogaus raumenų mio-

vamzdelių, iš kotelio skeleto raumenų lastelių linijų, tiek pelių, tiek žiurkių (žiūr. 7 pieš.). Panaudojus gautą iš žmogaus CNTFR bandinį, kai kuriose raumenų RNR mėginiuose aptiktos dvi iRNR rūšys: 2.0 ir 1.7 kb. 7 pieš. parodytas CNTF ekspresijos pasireiškimas raumenų lastelėse, tiek miovamzdeliuose, tiek mioblastuose, kurie gauti tiek iš pelių (1 ir 2 takeliai), tiek iš žiurkių (3 ir 4 takeliai), o taip pat žiurkės raudonojoje lėlo raumens (soleus) lastelėje ir baltojoje greito raumens EDL (extensor digitorum longus) lastelėse (atitinkamai 5 ir 6 takeliai). Nustatyta, kad CNTFR iRNR kiekis padidėjo tiek soleus raumenyje (12 takelis), tiek ir EDL raumenyje (14 takelis), kuriose prieš 72 val. buvo atlikta chirurginė nervo atjungimo operacija, siekiant palyginti šiuos raumenis su imituojančiais darbą kitos kūno pusės kontroliniais raumenimis (atitinkamai 11 ir 13 takeliai). Įdomu, kad didžiausia ekspresija pasireiškė RNR bandiniuose, kurie gauti iš žmogaus embriono skeleto raumenų miovamzdelių. Šie miovamzdeliai buvo kultivuoti, o po to išskirti iš fibroblastų arba kitų neraumeninių lastelių atrenkant aktyvuojamosios fluorescencijos lastelių atrinkimo metodu, prieš išskiriant iRNR (8 takelis). Autoriai nustatė ir identifikavo Northern-blot metodu dvi skirtingas CNTFR iRNR rūšis raumenų lastelėse, taip pat, kad CNTFR 1.7 kb ilgio transkriptas geriau ekspresavosi mioblastų C2C12mb lastelių linijoje (1 takelis). Tai galėtų reikšti alternatyviai giminingą receptoriaus formą.

Raumenų masės, o kartu ir miofibrilinio baltymo, mažėjimo dėl atrofijos (atjungus nervą) sustabdymas CNTF faktoriu

Chirurginė nervo atjungimo operacija

4 lentelėje nurodytos gyvūnų grupės, naudotos minėtiems klausimams tirti. Kaip taisyklė, kiekvieną grupę sudarė trys gyvūnai, kuriems atlikta pirminė 20 cm įpjova dešinėje užpakalinėje galūnėje, dubens viduryje. Raumens darbo imitacijai lokia pat 20 cm įpjova padaryta ir kairėje galūnėje.

2-6 grupių gyvūnams soleus raumenyje, dešinėje užpakalinėje galūnėje, atlikta chirurginė nervo atjungimo operacija: pašalinamas dubens viduryje dešinio sėdmeninio nervo segmentas (2-5 mm) ir

paliekama periferinio nervo dalis (32-35 mm), 8 pieš. A. Kairys raumuo atlieka kontrolės funkciją: juo imituojamas darbas, lengvai dirginant sėdmeninio nervo vietą, nutolusią 32-35 mm nuo soleus raumens inervacijos laško. Visos chirurginės operacijos padarytos gyvūnams, paveiktiems lengva chloro-pentobarbitoline anestezija, dozuojant 0.3 g - 1 kg gyvo svorio. 1 kontrolinės grupės gyvūnams nebuvo atlikta nei nervo atjungimo operacija, nei kokios nors injekcijos. Kiekvieno gyvūno masė 100-150 g.

Gydymas

1 ir 2 grupės gyvūnai nebuvo gydomi. 3 grupės gyvūnams kasdien 4 dienas į dešinės ir kairės galūnių vidurio dubens raumenis injekavo PBS ir BSA (1 mg/ml) mišinį. 4 grupės gyvūnams kasdien 4 dienas į tuos pačius raumenis injekavo žiurkės rONTF (1 mg - 1 kg gyvo svorio) ir BSA (1 mg/ml) mišinį. 5 grupės gyvūnams kasdien, bet po oda, injekavo rONTF ir BSA mišinį. 6 grupės gyvūnams kasdien po oda injekavo PBS ir BSA mišinį.

4 lentelė

Grupė	Gyvūnų sk. grupėje	Chirurginis protokolas	Atjungto nervo periodas, val.	Gydymas
1	3	Ne operuoti	96	Negyd.
2	—	Atjungtas deš. galūn. nervas; kairė galūnė imituoja darbą	—	—
3	—	—	—	PBS+BSA, 1 mg/ml
4	—	—	—	ONTF+BSA, 1 mg/ml i raumenis
5	—	—	—	ONTF+BSA, 1 mg/ml po oda
6	—	—	—	PBS+BSA, po oda

Raumenų masės ir baltymo kiekio tyrimas

Praėjus 96 val. po chirurginės nervo atjungimo operacijos,

60

gyvūnai dekapituojami, o soleus raumenys kruopščiai išpjaujami nuo sausgyslės iki sausgyslės. Po to iš soleus raumens preparato, padėto ant ledo, skalpeliu pašalinamos sausgyslės ir raumuo iškart pasveriamas. Miofibrilinio baltymo homogenatai ruošiami iš gyvūno soleus raumenu, kurie supjaustomi gabaliukais ant ledo šaltame kambaryje ir homogenizuojami PBS buferyje, kuriame yra 0.32 M sacharozės bei 3 mM MgCl (2.5% v/v). Homogenatas centrifuguojamas 800 g. Po to viršutiniame skysčio sluoksnyje analizuojamas bendras raumens miofibrilinio baltymo kiekis, naudojant "Bio-Rad Dye Binding" metodą, kuri rekomenduoja analizės preparatų gamintojai.

9 pieš. matyti, kad šviežias raumuo su atjungtu nervu greitai praranda svorį ($p < 0.01$); maždaug 25% per 96 val. Kasdieninės PBS ir BSA injekcijos neitakojo šiam masės praradimui. Vienok žiurkių, kurioms kasdien injekavo CNTF (1 mg - 1 kg gyvo svorio), soleus raumuo su atjungtu nervu tik 5% mažesne mase skyrėsi nuo kontrolinio, imituojančio darbą, kitos kūno pusės raumens. Soleus raumens, tiek su atjungtu nervu ir CNTFR poveikiu, tiek imituojančiu darbą, šviežios masės dydžiai labai nesiskyrė nuo neoperuotų kontrolinių raumenu atitinkamų dydžių. CNTF, kuri injekavo po oda 4 dienas (5 grupė), taip pat žymiai išreiškė, kad gali stabdyti miofibrilinio baltymo mažėjimą (dėl atjungto nervo), tuo pačiu ir šviežios raumeninio audinio masės mažėjimą (žiūr. 5 lent.).

5 lentelė

Raumeninio audinio pavyzdys	Bendras miofibril. balt. kiekis, mg 1 raumeniui	Darbo imitavimo procentinis (%) rodiklis
1 grupė - neatjungtu nervu	7.5	80
2 grupė - atjungtu nervu, be injekcijų, - darbo imitavimas, be injekcijų	5.8 7.2	80
3 grupė - atjungtu nervu + PBS į raumenis - darbo imitavimas, + PBS į raumenis	5.2 6.9	75
4 grupė - atjungtu nervu +CNTF į raumenis - darbo imitavimas +CNTF į raumenis	6.5 7.8	83
5 grupė - atjungtu nervu + CNTF po oda - darbo imitavimas	6.6 7.1	93

6 grupė - atjungti nervą	+ CNTF po oda	5.3	67
	+ PBS po oda		
- darbo imitavimas		7.9	
	+ PBS po oda		

Pastaba.

Pateikti duomenys rodo bendrą baltymo kiekį raumenyje (viename bandinyje apjungti 3 raumenys).

Kasdieninės CNTF injekcijos į raumenis sumažino įtaką bendram miofibrilinio baltymo kiekiui.

Autoriai nustatė, kad CNTF ekspresija pasireiškia tiek skelelinių raumenų miozomodeliuose, tiek mioblastuose ir kad atrofinių alvejų (atjungus nervą) CNTF slopdo tiek raumenų masės, tiek miofibrilinio baltymo mažėjimą.

Mikroorganizmo depozitas

Depozitas gautas iš "The Agriculture Research Culture Collection NRRL", adresas: 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA.

E.coli bakterija turi plazmidę pCMX-hCNTF, o būtent, ekspresinę plazmidę, turinčią seką, koduojančią hCNTF (suteikiant jai papildomą kodą NRRL B-18789).

Ansdiam ciliolata keltas prielaidų, kurių turinys paminėtas su nuoroda į šaltinį.

Esamas išradimas neapsiriboja eritimis, aprašytais šiame tekste, o taip pat pavyzdžių variantuose, kurie pateikti eilei išradimo aspektų iliustruoti, taip pat kituose funkcionali lygiavėriuose variantuose. Faktiškai įvairios išradimo modifikacijos bus aiškios šios srities specialistams ir jos gali priklausyti tam tikroms sritims, charakterizuojamoms išradimo apibrėžties punktais.

APIBRĖŽTIS

1. Išgryninta nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad koduoja oiliarinio neurotrofinio faktoriaus receptorių (CNTFR).

2. Nukleininės rūgšties molekulė, pagal Apibrėžties 1 punktą, besiskirianti tuo, kad pasižymi seka, iš esmės pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:1), arba mažiausiai šešių nukleotidų fragmentu.

3. Nukleininės rūgšties molekulė, pagal Apibrėžties 2 punktą, besiskirianti tuo, kad yra kDNR.

4. Išgryninta nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad turi mažiausiai šešių nukleotidų sekos (2 pieš. SEQ ID No:1) dalį.

5. Išgryninta nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad turi mažiausiai šešių nukleotidų sekos (2 pieš. SEQ ID No:1) dalį, be to su mutacija.

6. Išgryninta antros nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad turi pirmos nukleininės rūgšties (2 pieš. SEQ ID No:1) dalį, galinčią hibridizuotis.

7. Išgryninta nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad koduoja baltymą, kurio aminorūgščių seka pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:2), arba jo dalį, mažiausiai iš šešių aminorūgščių, arba jo darinį.

8. Organizmas besiskiriantis tuo, kad turi nukleininės rūgšties molekulę, pagal Apibrėžties 1, 2 ir 7 punktus.

9. Organizmas, pagal Apibrėžties 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra mikroorganizmas.

10. Mikroorganizmas, pagal Apibrėžties 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra bakterija.

11. Mikroorganizmas, pagal Apibrėžties 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra mielės.

12. Organizmas, pagal Apibrėžties 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra transgeninis gyvūnas.

13. Ląstelė besiskirianti tuo, kad turi nukleininę rūgštį, pagal Apibrėžties 1, 2 ir 7 punktus.

14. Imortalizuotų ląstelių linija besiskirianti tuo, kad turi nukleininę rūgštį, pagal Apibrėžties 1, 2 ir 7 punktus.

15. Nukleininės rūgšties molekulė, pagal Apibrėžties 1, 2 ir

7 punktus, besiskirianti tuo, kad pasižymi seka, galinčia kontroliuoti genu ekspresija.

16. Išgryninto CNTFR molekulė besiskirianti tuo, kad turi aminorūgščių seka, pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:2), arba jos dalį, turinčią mažiausiai šešias aminorūgštis.

17. Monokloninis antikūnas, pagal Apibrėžties 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad atpažysta CNTFR.

18. Lastelės, surištos su CNTF, identifikacijos metodas, besiskiriantis tuo, kad aptinkama CNTFR ekspresija.

19. Metodas, pagal Apibrėžties 18 punktą, besiskiriantis tuo, kad nustatoma CNTFR koduojanti RNR, hibridizuojant lastelės, kurioje manoma yra CNTFR koduojanti RNR, bandinį su mėginiu nukleininės rūgšties, turinčios mažiausiai 6 nukleotidų seka, pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:1).

20. Būdas, pagal Apibrėžties 18 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTFR baltymas nustatomas: (1) veikiant lastelę CNTFR specifiku antikūnu tokiomis sąlygomis, kuriomis vyksta imunospecifinis surišimas, ir (2) aptinkant antikūno ir lastelės susirišimą.

21. Analizės sistema besiskirianti tuo, kad tikrinami farmacinių junginių aktyvumai, lyginant su CNTF, ir pasižyminti lastelėmis, turinčiomis rekombinantinės nukleininės rūgšties molekulę, kurios seka pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:1), arba jos dalį, ne mažesnę negu šeši nukleotidai.

22. Analizės sistema besiskirianti tuo, kad tikrinami farmacinių junginių aktyvumai, lyginant su CNTF, ir pasižyminti lastelėmis, ekspresuojančiomis rekombinantinį CNTFR baltymą arba funkcionaliai aktyvią jo molekulės dalį.

23. Analizės sistema, pagal Apibrėžties 22 punktą, besiskirianti tuo, kad pasižymi rekombinantiniu CNTFR baltymu, turinčiu aminorūgščių seka, pavaizduota 2 pieš. (SEQ ID No:2), arba mažiauusiai šešių aminorūgščių fragmentą.

24. Eksperimentinė modelinė sistema fiziologiniam CNTF poveikiui tirti besiskirianti tuo, kad pasižymi lastelėmis, kurios turi rekombinantinę, koduojančią CNTFR nukleininę, rūgštį ir savo paviršiuje ekspresuoja padidintą receptorių (CNTFR) kiekį, lyginant su to pačio tipo lastelėmis, bet neturinčiomis nukleininės rūgšties, koduojančios CNTFR.

25. Sistema, pagal Apibrėžties 24 punktą, besiskirianti tuo,

63

kad yra transgeninio gyvūno organizmas.

26. Transgeninio gyvūno (bet ne žmogaus) organizmas besiskiriantis tuo, kad turi transgeną, kuris koduoja rekombinantinį CNTFR, neasocijuojanti su ląstelės paviršiumi.

27. Transgeninio gyvūno (bet ne žmogaus) organizmas besiskiriantis tuo, kad turi transgeną, kuris koduoja rekombinantinį CNTFR, neturinti biologinio atsako į CNTF.

28. Paciento, susirgusio dėl CNTF, diagnostikos būdas besiskiriantis tuo, kad aptinkami CNTFR kiekio skirtumai ląstelėse arba audiniuose, lyginant su sveiko žmogaus analogiškų ląstelių arba audinių CNTFR kiekiu.

29. Paciento, susirgusio dėl CNTF, diagnostikos būdas besiskiriantis tuo, kad aptinkami CNTFR kiekio skirtumai skysčiuose, paimtuose iš paciento organizmo, lyginant su sveiko žmogaus analogiškų skysčių CNTFR arba jo fragmentų kiekiu.

30. Paciento, susirgusio dėl CNTF, diagnostikos būdas besiskiriantis tuo, kad paciento bandinyje aptinkami CNTFR RNR kiekio skirtumai, lyginant su sveiko žmogaus analogiškų bandiniu.

31. Būdas, pagal Apibrėžties 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTFR RNR kiekis nustatomas, hibridizuojant nukleininės rūgšties bandinį su nukleininės rūgšties mėginiu, turinčiu dalį sekos (mažiausiai iš šešių nukleotidų), pavaizduotos 2 pieš. (SEQ ID No:1).

32. Būdas, pagal Apibrėžties 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTFR arba jo fragmento kiekis nustatomas: (1) veikiant ląsteles arba audinį antikūnu, specifisku minėtam receptoriui, tokiomis sąlygomis, kuriomis vyksta imunospecifinis surišimas su CNTFR, ir (2) matuojant surišančio antikūno kiekį.

33. Būdas, pagal Apibrėžties 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTFR kiekis nustatomas: (1) veikiant ląsteles arba audinį žymėtu CNTF tokiomis sąlygomis, kuriomis vyksta surišimas su CNTFR, ir (2) matuojant žymėto CNTF kiekį.

34. Paciento, kenčiančio neurologiniu susirgimu, gydymo būdas besiskiriantis tuo, kad pacientui skiriamas efektyvus CNTFR baltymo, jo funkcionaliai aktyvaus fragmento arba darinio kiekis.

35. Būdas, pagal Apibrėžties 34 punktą, besiskiriantis tuo, kad CNTFR baltymas, jo peptidinis fragmentas arba darinys sugeba surišti CNTF.

36. Būdas, pagal Apibrēzties 34 punkta, besiskiriantis tuo, kad skiriamas CNTFR lokaliniam efektui pasiekti.

37. Paciento, kenčiančio neurologiniu susirgimu, gydymo meto-
das besiskiriantis tuo, kad pacientui įvedama nukleininės rūgšties
molekulė, koduojanti CNTFR arba jo funkcionalia, aktyvią dalį, to-
kiu būdu, kad šios nukleotidinės sekos veikimas pasireiškia tera-
peutiškai efektyvaus CNTFR (arba jo dalies) kiekio gaminimusi.

38. Būdas, pagal Apibrėties 34, 35 arba 37 punktus, besiski-
riantis tuo, kad gydomas neurologinis sutrikimas yra trauminis.

39. Būdas, pagal Apibrėzties 34 punkta, besiskiriantis tuo,
kad gydomas neurologinis sutrikimas yra judėjimo neuronų disfunk-
cija.

40. Būdas, pagal Apibrėties 39 punkta, besiskiriantis tuo,
kad gydomas susirgimas yra amiotrofinė lateralinė sklerozė.

41. Farmacinė kompozicija besiskirianti tuo, kad turi CNTFR
baltymą, jo peptidinius fragmentus arba darinius, o taip pat far-
maciškai tinkamą nešėją.

42. Farmacinė kompozicija besiskirianti tuo, kad turi amino-
rūgščių seką, nesiskiriančią nuo pavaizduotos 2 pieš. (SEQ ID
No:2), arba jos dalį (ne mažiau 6 aminorūgščių), o taip pat farma-
ciškai tinkamą nešėją.

43. Molekulių, giminingų CNTFR ir sudarančių šeimą, apimančią
IL-6 receptorių, identifikavimo būdas besiskiriantis tuo, kad:

(1) tikrinama DNR biblioteka klonais, kurie hibridizuojausi su
CNTF receptorių koduojančia nukleinine rūgštimi;

(2) išskiriami ir dauginami klonai, galintys hibridizuotis su
CNTFR koduojančia nukleinine rūgštimi;

(3) nustatomos klonų, išskirtų ir padaugintų (2) stadijoje,
nukleotidų sekos; ir

(4) palyginamos (3) stadijoje nurodytos nukleotidų sekos su
žinomų šeimos narių sekomis.

44. Paciento, kenčiančio raumeninių ląstelių funkcinio sutri-
kimu, gydymo būdas besiskiriantis tuo, kad pacientui įvedama nuk-
leininės rūgšties molekulė, koduojanti CNTFR arba jo funkcionalia
aktyvią dalį, tokiu būdu, kad minėtos nukleotidinės sekos veikimas
paciento organizme pasireiškia terapeutiškai efektyvių CNTFR (arba
jo dalies) kiekių gaminimusi.

45. Išgryninta molekulė besiskirianti tuo, kad skiriasi nuo

40

CNTF ir konkuruoja su juo, rišantis su CNTFR.

46. Sistema besiskirianti tuo, kad modeliuoja autoimuninį susirgimą ir yra gyvūno, imunizuoto imunogenišku CNTFR kiekiu, organizmas.

47. Išgryninta antros nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad yra komplementari, pagal Apibrėžties 1 punktą, nukleininės rūgšties molekulei.

48. Išgryninta antros nukleininės rūgšties molekulė besiskirianti tuo, kad yra komplementari, pagal Apibrėžties 2 punktą, nukleininės rūgšties molekulei (arba jos fragmentui).

49. Išskirtų ląstelių kompozicija besiskirianti tuo, kad ekspresuoja rekombinantinį CNTFR arba jo funkcionalią aktyvią dalį.

50. Paciento, kenčiančio nervų-raumenų arba raumenų susirgimu, gydymo būdas besiskiriantis tuo, kad pacientui injekuojamas efektyvus CNTF baltymo, jo funkcionalios aktyvios dalies arba darinio kiekis.

51. Paciento, kenčiančio audinių arba kokios nors rūšies ląstelių susirgimu, gydymo būdas besiskiriantis tuo, kad pacientui injekuojamas efektyvus CNTF baltymo, jo funkcionalios aktyvios dalies arba darinio kiekis, be to minėto tipo audinys arba ląstelės paciento ir sveiko žmogaus organizmuose ekspresuoja CNTFR.

52. Būdas, pagal Apibrėžties 50 punktą, besiskiriantis tuo, kad gydoma raumenų atrofija.

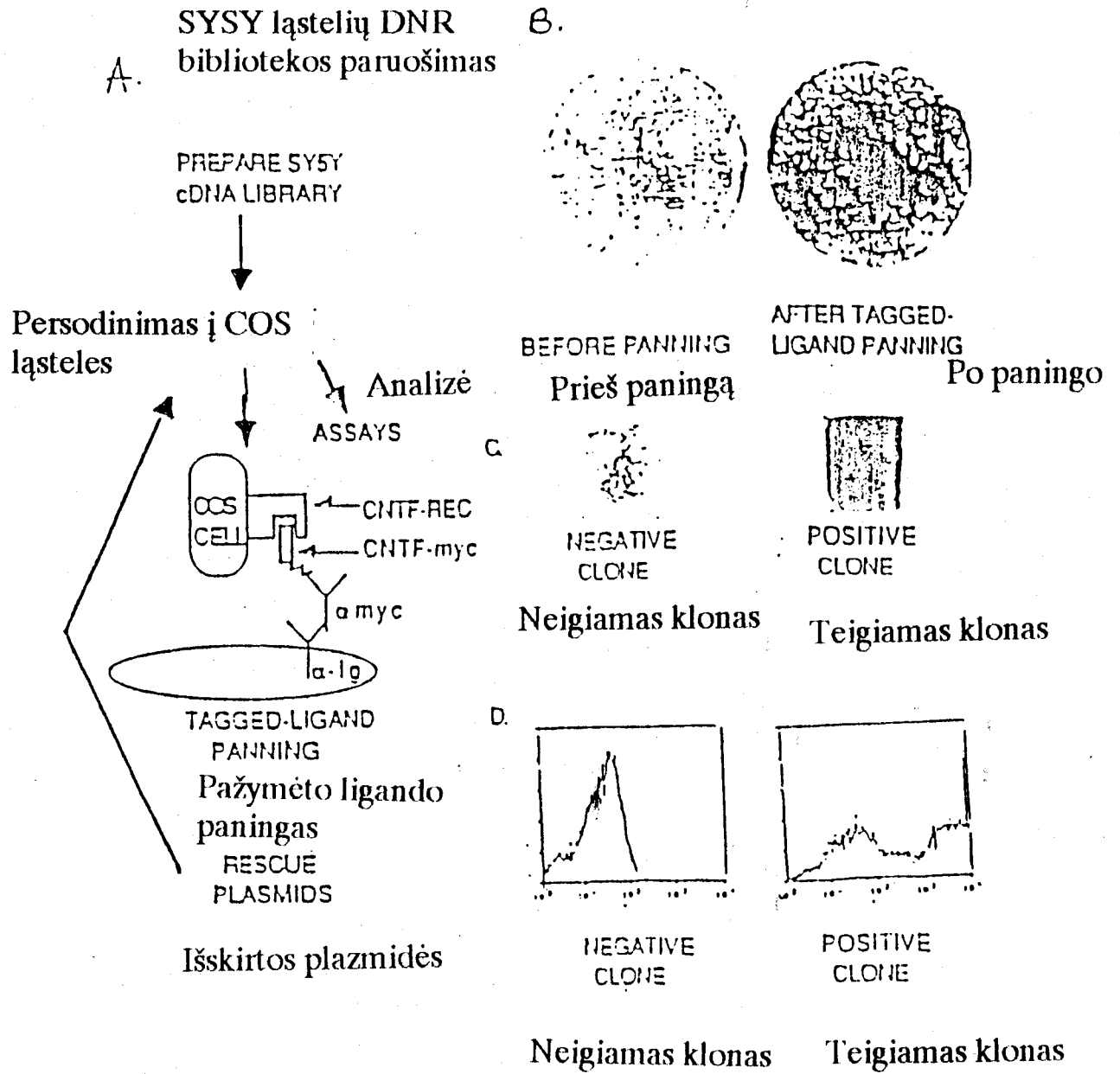
53. Būdas, pagal Apibrėžties 52 punktą, besiskiriantis tuo, kad gydoma denervacija, chroniška neveikla, metabolitis stresas ir nepakankamos mitybos atvejais.

54. Būdas, pagal Apibrėžties 52 punktą, besiskiriantis tuo, kad gydoma raumenų atrofija, kuri yra raumenų distrofijos sindromo, įgimtos miopatijos, raumenų uždegimo ir toksinės miopatijos rezultatas.

55. Būdas, pagal Apibrėžties 52 punktą, besiskiriantis tuo, kad gydoma raumenų atrofija, kuri yra nervo traumos, periferinės neuropatijos, sutrikimo dėl vaistų arba toksinų ir judėjimo neuropatijos rezultatas.

56. Nukleininė rūgštis besiskirianti tuo, kad turi CNTFR nukleotidų seką, kuri yra pCMX-hCNTFR plazmidėje, deponuotoje NRRL ir pažymėta B-18789.

FIG. 1



CNTF receptoriaus homologai

Imunoglobulinio pobūdžio sritis

NCMTR	42	VTLP	C	-8 aa-	V	T	M	---	H	V	-13aa-	Q	L	V	L	HGLELGHIS	G	L	V	A	C	F
NILAR	43	VTLT	C	-10aa-	V	H	M	VL	R	X	-15aa-	R	L	L	L	RSVOLIDS	G	H	I	S	C	T
NDA	511	LWLS	C	-9 aa-	V	S	M	---	H	I	-9 aa-	V	L	F	I	AKITPISAM	G	T	I	A	C	F
PDGTR		ITIR	C	-9 aa-	F	O	M	TTP	R	H	-22aa-	I	L	H	H	PTAELEDS	G	T	T	T	C	H
CST-1R		AGIV	C	-8 aa-	I	D	V	SL	H	H	-22aa-	J	L	H	L	DNVSFGDA	G	M	I	S	C	T
ALPHA1 3-QP		VTLT	C	-8 aa-	F	O	L	---	H	R	-18aa-	F	F	H	L	NAVALGDC	G	H	I	T	C	R

Citokininio receptoriaus pobūdžio sritis

NCMTR	116	C	RSMTYPKGSY	C	S	M	-28aa-	C	-9 aa-	C	-33aa-	F	D	E	T	I	V	XPDP	P	EN	V	VARPVSMPHULE	V	T	M	-53aa-	V	AAA	---	DNELCT	P	D			
NILAR	121	C	TRACPLSMV	C	E	M	-30aa-	C	-10aa-	C	-32aa-	F	G	C	C	G	I	L	XPDP	P	AN	I	TVTAVANP	P	H	L	-50aa-	V	VOLNA	CEFFUGCI	P	E	M		
IFRLA	31	C	RSPO-NHTT	C	M	M	-26aa-	C	-10aa-	C	-33aa-	V	D	V	T	T	I	V	EPDP	P	RM	L	TLEVOLNDRKTT	L	-	M	-55aa-	V	OTRON	UN	---	GT	M		
ALJON	52	C	PTOR-LIDL	C	F	M	-25aa-	C	-15aa-	C	-29aa-	C	I	L	N	E	V	V	LLDA	P	AG	L	-	LAUWALEGSIM	L	R	M	-53aa-	V	KANNA	-UP	S	SGT	M	
NILAR	36	C	PTNS-NANIS	C	V	M	-25aa-	C	-11aa-	C	-37aa-	F	P	F	E	M	L	ALPHA	P	IS	L	OV-VIVETIURCH	-	I	S	M	-55aa-	V	KANPL	-O	CE	ETT	M		
ALJON	34	C	FDUT-IRTOT	C	E	M	-25aa-	C	-11aa-	C	-28aa-	F	P	S	O	N	V	RPLA	P	DM	L	TLITWSD	-E	N	L	T	M	-57aa-	V	KVNS	---	O	ILTCT	M	
NDA-CCTA	125	C	FTYN-NULAN	C	T	M	-25aa-	C	-12aa-	C	-31aa-	L	D	T	N	K	I	E	SNP	P	SN	V	TV	---	SGVITIEL	V	R	M	-56aa-	V	KIRAA	-O	-VRILA	P	S

FIG. 3

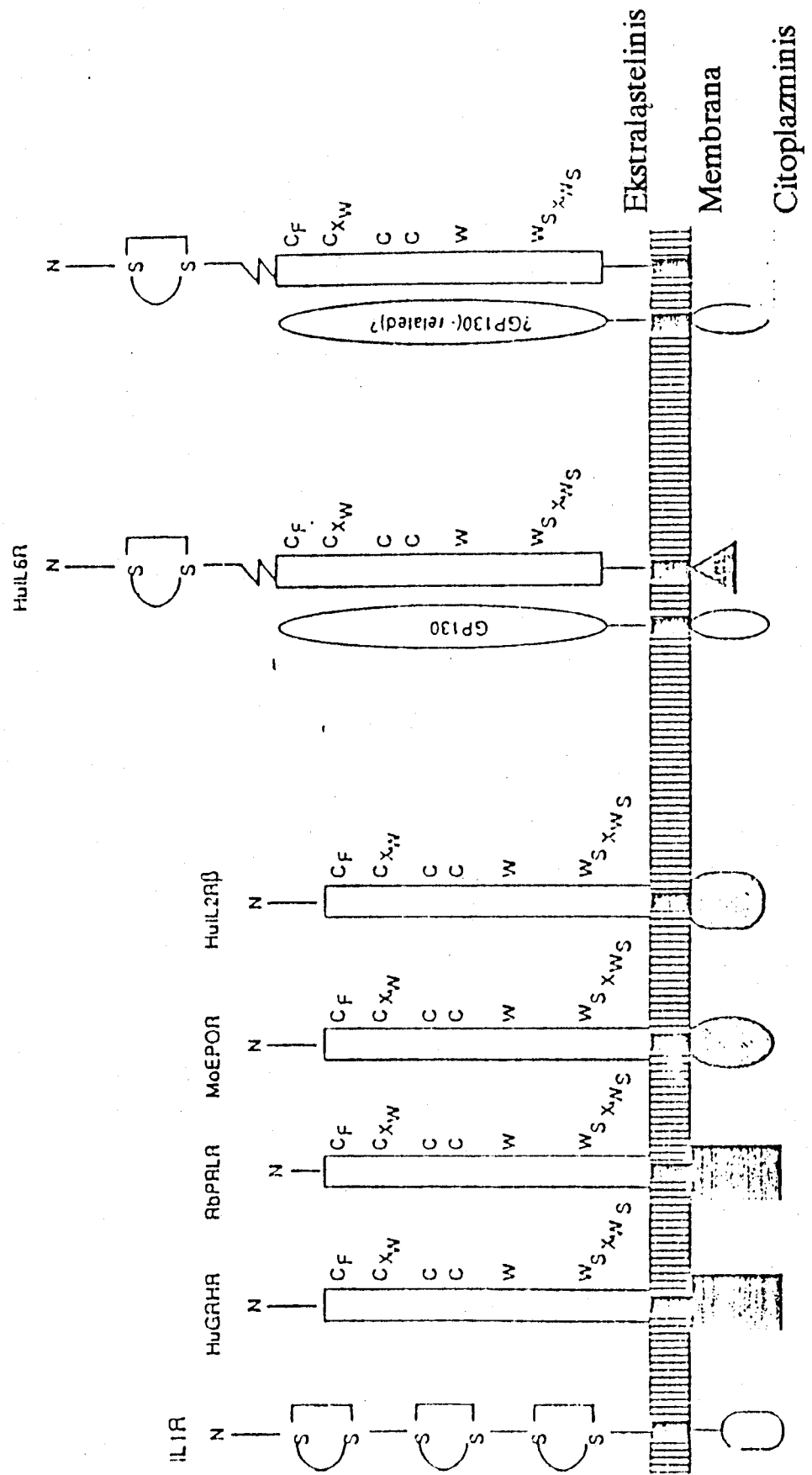


FIG. 4

FIG. 5

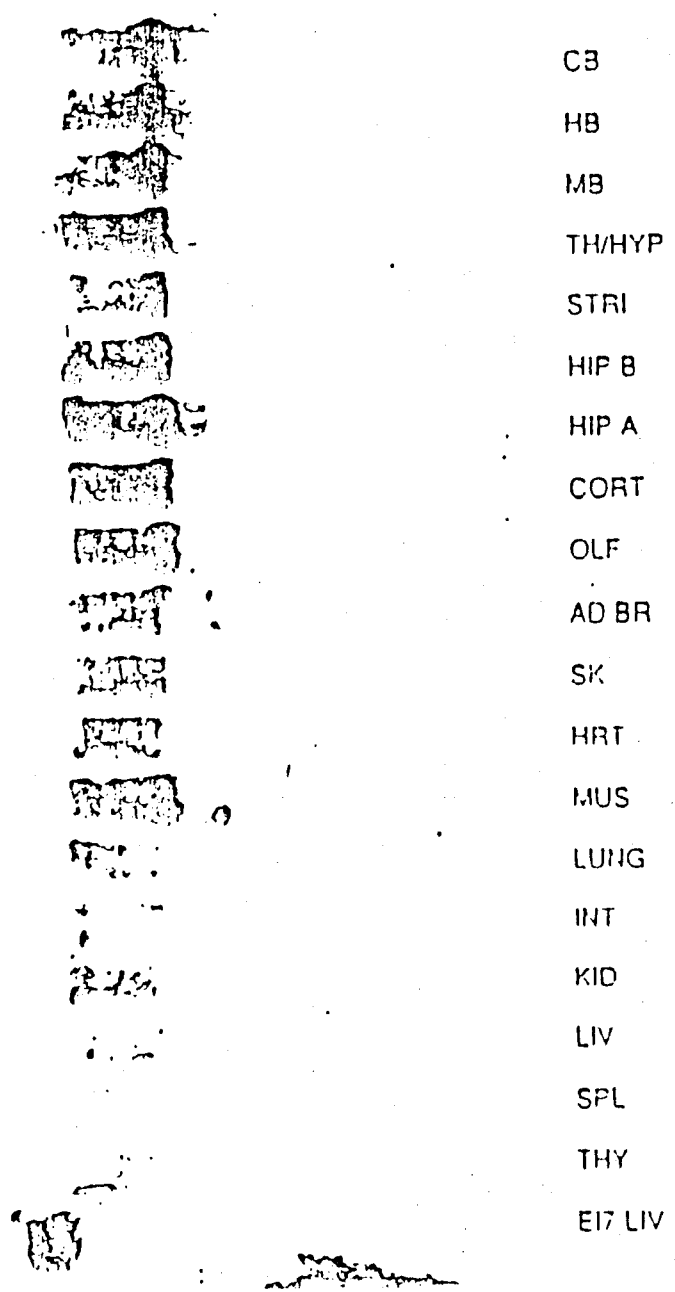


FIG. 6

pCMX-hCNTFR

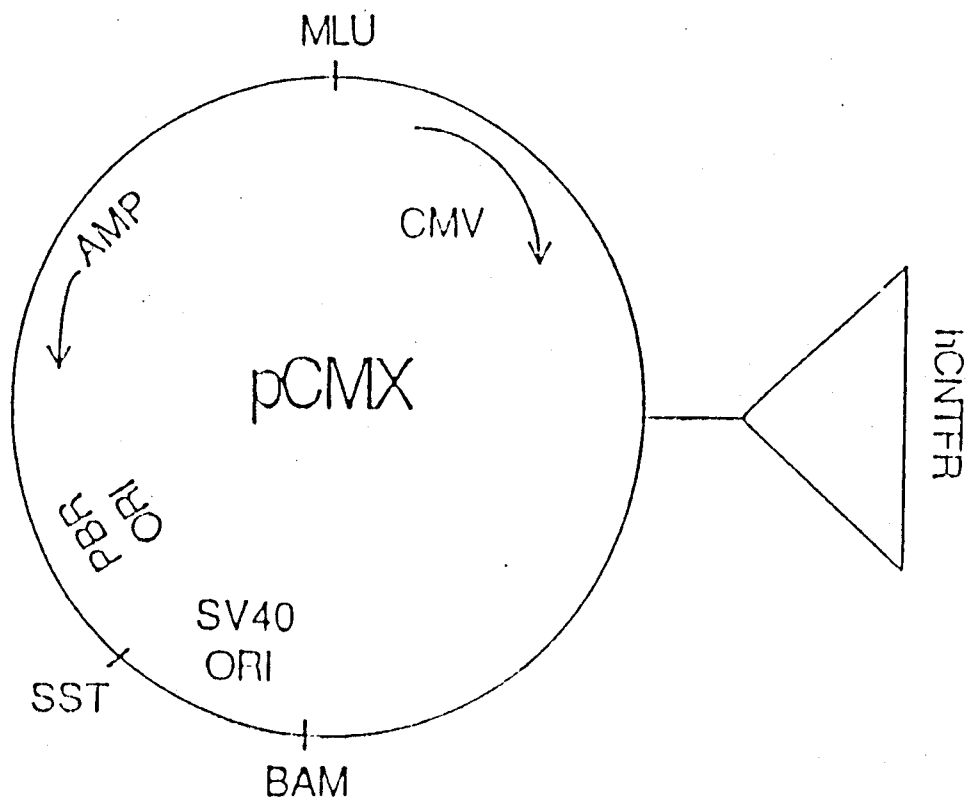


FIG. 7

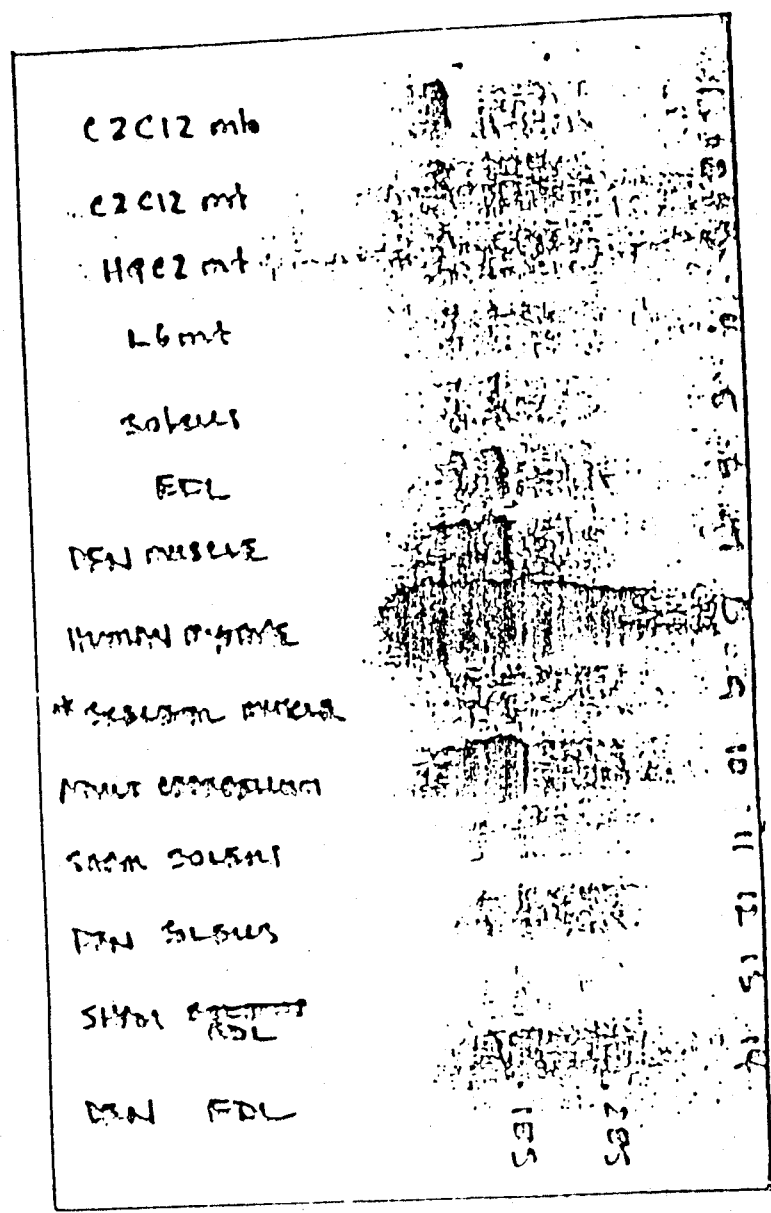


FIG. 8

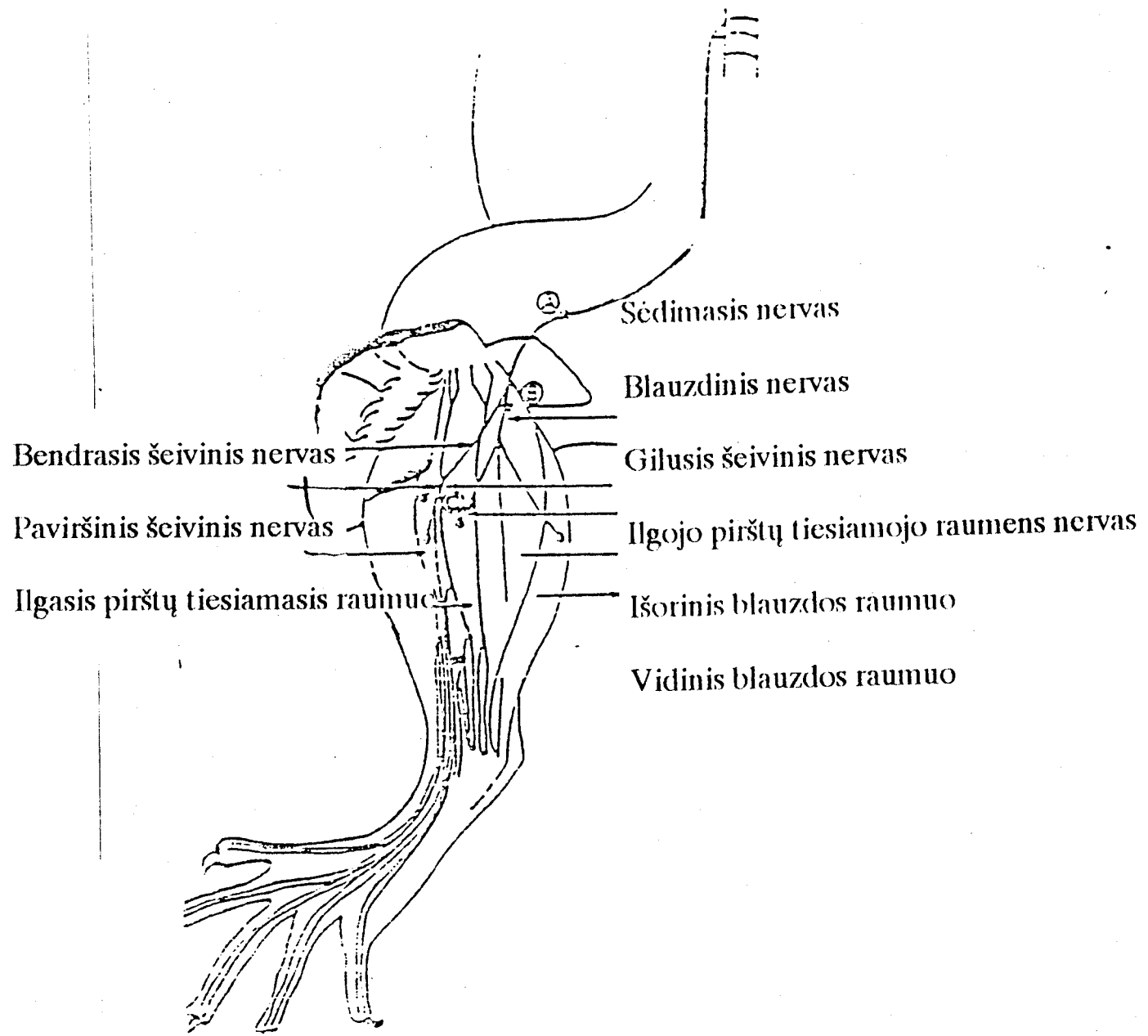


FIG. 9

