

(19)



(10) **LT 4019 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4019**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/12**

(21) Paraiškos numeris: **IP1771**

C12N 15/66

C12N 5/00

A61K 37/02

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 13**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 08 26**

(60) SU duomenys: **SU 4895869, 1991 06 14**

(31, 32, 33) Prioritetas: **422383, 1989 10 16, US**

537198, 1990 06 11, US

573616, 1990 08 24, US

(72) Išradėjas:

Kristina M. Zsebo, US

Robert A. Bosselmann, US

Sidney Vaughn Suggs, US

Francis Hall Martin, US

(73) Patent savininkas:

AMGEN INC., 1840 DeHavilland Drive, Thousand Oaks, California 91320-1789, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Poliipeptidai, DNR-sekos, ląstelė, kamieno ląstelių faktoriaus gavimo būdas, kompozicijos, kamieno ląstelių faktoriaus išskyrimo būdas, polimero-peptido adukto gavimo būdas, transfekcijos būdas, geno perkėlimo būdas

(57) Referatas:

Rasti nauji kamieninių ląstelių faktoriai, juos koduojantys oligonukleotidai ir jų gavimo būdai. Taip pat rastos farmacinės kompozicijos, turinčios savo sudėtyje minėtus faktorius.

Ši paraiška yra tęsinys paraiškos, kurios registracijos Nr 573616, išduotos 1990 rugpjūčio 24 d., kuri yra tęsinys paraiškos reg. Nr 537198, pateiktos 1990 birželio 11 d., kuri yra tęsinys paraiškos reg. Nr 422383, paduotos 1989 spalio 16 d.; visos jos įtrauktos kaip išnašos aprašyme.

Šiuo išradimu pateikiami nauji faktoriai, kurie stimuliuoja primityvias pirmines ląsteles, įskaitant ankstyvasias kraujodaros pirmines ląsteles pagal DNR sekas, koduojančias tokius faktorius. Iš dalies, šis išradimas susijęs su šiais naujais faktoriais, jų fragmentais ir polipeptidų analogais ir DNR, koduojančios šiuos fragmentus ir analogus, sekomis.

Išradimo pagrindimas

Žmogaus kraujo susidarymo sistema (kraujodaros sistema) įjungia daugybę baltųjų kraujo kūnelių (tai neutrofilai, makrofagai, bazofilai, bazinės ląstelės, eozinofilai, T- ir V-ląstelės, raudonieji kraujo kūneliai (eritrocitai) ir tromboląstelės (megakariocitai, trombocitai).

Manoma, kad nedidelis kiekis tam tikrų kraujodaros augimo faktorių iššaukia diferenciaciją nedidelio kiekio "kamieninių ląstelių", kurios yra kaip pirminės kraujo ląstelės, sukelia labai greitą šių ląstelių dauginimąsi ir sąlygoja galutinę šių linijų subrendusių kraujo ląstelių diferenciaciją. Kraujodaros regeneracinė sistema gerai funkcionuoja esant normalioms sąlygoms. Tuo tarpu paveikus chemoterapiškai, apšvitinus arba esant natūraliems mielodiplastiniams pažeidimams pasireiškia periodas, kurio metu pacientui atsiranda rimta leukopenija, anemija ar trombocitopenija.

Kraujodaros faktorių suaktyvinimas ir panaudojimas pagreitina kaulų čiulpų regeneraciją šiuo pavojingu periodu. Esant kai kuriems virusiniams pažeidimams, pvz. imuninio deficito sindromui (AIDS), kraujo elementai tokie kaip T-ląstelės, gali būti specifiškai suardomi. Tokiais atvejais sustiprintas T-ląstelių produkavimas gali turėti terapinį veikimą.

Kadangi kraujodaros faktoriai egzistuoja labai mažais kiekiais, jų aptikimas ir identifikavimas remiasi analizių sistema, kurių metu įmanomas tikslus išskirstymas pagal

skirtingus faktorius, remiantis stimuliuojančiais efektais, kurie veikia kultivuojamas ląsteles dirbtinėse sąlygose.

Rekombinantinių genetinių metodų panaudojimas įgalino suprasti individualių augimo faktorių biologinį aktyvumą. Pvz., buvo gautos aminorūgščių sekos ir DNR žmogaus eritropoetinui (EPO), kuris stimuliuoja eritrofilų gamybą (žr., Lin, JAV patentas 4703008, įtrauktas į aprašymus kaip išnaša). Rekombinantiniai metodai taip pat buvo panaudojami komplementarios DNR granuliocitinio faktoriaus išskyrimui, kuris stimuliuoja kolonijas (G-CFS) (žr., Souza, JAV patentas 4810643, įtrauktas į aprašymus kaip išnaša) ir faktoriaus, stimuliuojančio makrofagines žmogaus granuliocito (GM-CFS) kolonijas (Lee ir kiti, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82 t., 4360-4364 psl.; Vong ir kiti, Science, 1985, 228 t., 810-814 psl.), pelių granuliocitinio ir žmogaus granuliocito-makrofaginio-CFS (Yokota ir kiti, Proc Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81 t., 1070 psl.; Fung ir kiti, Nature, 1984, 307t., 233 psl; Hoyhx ir kiti, Nature, 1984, 309 t., 763 psl.) ir faktoriaus, stimuliuojančio žmogaus makrofago (CFS-1) kolonijas (Kawasaki ir kiti, 1985, 230 t., 291 psl.).

Ląstelės, sudarančios kolonijas su aukštu audringo dauginimosi potencialu (HPP-CFS), ir jų analizės sistema buvo išbandytos faktorių poveikiu (Zont, J. Exp. Med., 1984, 159 t., 679-690 psl.). Literatūroje yra nemažai pranešimų apie faktorius, kurie yra aktyvūs analizuojant HPP-CFS. Šių faktorių šaltiniai nurodomi 1 lentelėje. Žemiau aptariami geriau charakterizuoti faktoriai.

Žmogaus blužnies aktyvumas kondicinėje terpėje išreiškiamas sinergizmo faktoriumi (SF). Kai kurie žmogaus audiniai, taip pat žmogaus ir pelių ląstelių linijos gamina sinergetinį faktorių, pavadintą SF-1, kuris sąveikauja sinergetiškai su CSF-1, stimuliuoja išankstinį HPP-CFS. Sinergetinis faktorius SF-1 pasireiškia žmogaus blužnies kondicinių ląstelių terpėje, taip pat juo pasižymi žmogaus placentos ląstelės, ląstelės 5637 (pūslinės karcinomos ląstelių linija) ir EMT-6 (pelių pieno liaukų karcinomos ląstelių linija). Tačiau nenustatytas SF-1 ląstelių identiškumas. Pirmiausiuose pranešimuose pateikiamas interleukino-1 su SF-1 aktyvumo blokavimas (Scebo ir kiti, Blood, 1988, 71 t., 962-968 psl.). Tačiau paskutiniaais pranešimais buvo pademonstruota, kad interleukinas-1 (IL-1) sąveikoje su CSF-1 negali stimuliuoti tokių

kolonijų susidarymo, kurios būtų gautos iš CSF-1 kartu su dalinai išvalytu kondicinės terpės 5637 preparatu (MacNiec. Blood, 1989, 73 t., 919 psl.).

Sinergetiniu faktoriumi, esančiu apvaisintos pelės gimdoje yra CSF-1. WEHL-3 ląstelių (pelių mielomonocitinės leukemijos ląstelių linija) produkuojamas sinergetinis faktorius, kuris, kaip pasirodė, yra identiškas interleukinui-3. Kaip CSF-1, taip ir IL-1 stimuliuoja kraujodaros pirmtakai, kurie yra labiau subrendę, negu SF-1 taikiny.

Buvo parodyta, kad TC-1 ląstelių (stromalinės ląstelės, gautos iš kaulų čiulpų) kondicinėje terpėje yra kitos klasės sinergetinis faktorius. Ši ląstelių linija produkuoja faktorių, kuris stimuliuoja ankstyvojo mieloidinio tipo, o taip pat limfoidinio tipo ląsteles. Jis buvo pavadintas kraujolimfodaros augimo faktoriumi-1 (HLG-1). Jo molekulinė masė 120000 (MakNies ir kiti, Exp. Hematol. 1988, 16 t., 383 psl.).

Iš žinomų interleukinų ir CSF faktorių nustatyta, kad IL-1, IL-3 ir CSF-1 pasižymi aktyvumu analizuojant HPP-CSF. Kiti sinergetinio aktyvumo šaltiniai paminėti I lentelėje ir struktūriškai neidentifikuoti. Remiantis polipeptidine seka ir biologinio aktyvumo profiliu, pateikiamas molekulės išradimas, kuri skiriasi nuo IL-1, IL-3, CSF-1 ir SF-1.

I lentelė

Šaltinis ¹	Išnaša
Žmogaus blužnies kondicinė terpė (CM)	Kriegler, Blood, 31888860, 503(1982)
Pelės blužnies CM	Bradley, Exp.Hematol.Today, Baum, 285(1980)
Žiurkės blužnies CM	Bradley, supra, (1980)
Pelės plaučių CM	Bradley, supra, (1980)
Žmogaus placentos CM	Kriegler, supra (1982)
Vaisingos pelės CM	Bradley, supra, (1980)
GTC-C CM	Bradley, supra, (1980)
RH3 CM	Bradley, supra, (1980)
PHA PBL	Bradley, supra, (1980)
WEHL-3B CM	McNience, Cell Biol.Int.Rep., 6,243 (1982)
EMT-6 CM	McNience, Exp.Hematol., 15,854 (1987)

CML-ląstelės	Kriegler, Exp.Hematol., 12,844 (1984)
5637 CM	Stanley, Cell, 45, 667 (1986)
TC-1 CM	Song, Blood, 66, 273, (1985)

¹ CM - kondicinė terpė

Naudojant parenteralinį būdą, baltymai dažnai (greitai) išskaidrėja nuo cirkuliacijos ir todėl gali pasireikšti santykinai trumpu farmakologinio aktyvumo periodu. To pasekoje, norint išlaikyti terapinį efektą, gali prireikti dažnų injekcijų ir atitinkamai didelių dozių bioaktyvių baltymų. Žinoma, kad baltymai modifikuoti kovalentiškai prijungiant vandenyje tirpstančius polimerus, tokius kaip polietilenglikolis, polietilenglikolio polipropilenglikolio polimerus, karboksimetilceliuliozę, dekstraną, polivinilo alkoholį, polivinilpirolidoną arba poliproliną, pasižymi atitinkamai dideliu skilimo periodu kraujyje, juos įvedus intraveniškai, lyginant su nemodifikuotų baltymų išsiskaidymo periodu (Abuchovskii ir kiti, Fermentai ir medikamentai, red. CHolcenberg ir kiti, Wiley-Interscience, New York, 367-383 psl. (1981), Newmark ir kiti, V.Appl. Biochem., 1982, 4 t., 185-189 psl.; Katre ir kiti, Proc. Natl. Acad. Sci. 5A, 1987, 84 t., 1487-1491 psl.). Be to, tokios modifikacijos gali padidinti baltymų tirpumą vandeniniuose tirpaluose, išvengti agregavimo, sustiprinti baltymo fizikinį ir cheminį stabilumą ir žymiai sumažinti baltymo imunogeniškumą ir antigeniškumą. To pasekoje gali būti pasiekiamas norimas biologinis aktyvumas įvedus gyvam organizmui tokius polimero-baltymo aduktus rečiau, arba mažesnėmis dozėmis, lyginant su nemodifikuotais baltymais.

Ypač yra naudingas polietilenglikolio (PEG) prijungimas prie baltymų, nes PEG pasižymi labai žemu toksiškumu žinduoliams (Karpenter ir kiti, Toxicol., Appl. Pharmacol. 1971, 18 t., 35-40 psl.). Pvz., JAV leidžiama naudoti polietilenglikolio ir adenoindeaminazės aduktą, gydant žmogaus stiprų kombinuotą imunodeficito sindromą. Kitas pranašumas, pasiekiamas PEG konjugacija, yra tas, kad efektyviai sumažėja heterologinių baltymų imunogeniškumas ir antigeniškumas. Pvz., polietilenglikolio aduktas su žmogaus baltymu gali būti naudingas gydant kito tipo žinduolių susirgimus, nebijant imuninės reakcijos efektų pasireiškimo.

Polimerus, tokius kaip PEG, galima patogiai prijungti prie vienos ar kelių sugebančių reaguoti baltymo aminorūgščių liekanų, tokių kaip alfa-amino grupės amino-galo

aminorūgščių, epselon-aminogrupės šoninių lizino grandinių, sulfhidrilinės grupės cisteino šoninių grandinių, karboksilinės grupės aspartilo ir glutamilo šoninių grandinių, alfa-karboksilinė grupės karboksi-galo aminorūgšties, tirozino šoninės grandinės arba aktyvuotos glikozilinės grandinės, prijungtos prie asparagino, serino ar treonino kai kurių liekanų.

Aprašyta daugybė PEG aktyvuotų formų, tinkamų sąveikai su baltymais. Naudingi polietilenglikolio reagentai reakcijai su baltymų aminogrupėmis apima aktyvius anglies rūgšties esterius arba karbonato darinius, ypač tuos, kuriuose atskeliama grupė yra N-hidroksisukcinimidas, para-nitrofenolis, imidazolas arba 1-hidroksi-2-nitrobenzen-4-sulfonatas. Polietilenglikolio dariniai, turintys maleimido- ar halogenacetilo grupes yra naudingi reagentai modifikuojant sulfhidrilines grupes, nesurištas su baltymais. Analogiškai, polietilenglikolio reagentai, turintys amino-, hidrazino- ar hidrazido grupes, yra naudingi sąveikoje su aldehidais, kurie susidaro baltymuose, veikiant angliavandenilių liekanas periodatu.

Šio išradimo tikslas yra pateikti faktorių, iššaukiantį ankstyvųjų pirminių kraujodaros ląstelių augimą.

Išradimo reziumė

Šiuo išradimu yra pateikiami nauji faktoriai, čia vadinami "kamieninių ląstelių faktoriai" (CSF), kurie pasižymi savybe stimuliuoti primityvių pirminių, įskaitant ankstyvasias kraujodaros ląsteles, augimą. Šie faktoriai taip pat gali stimuliuoti nekraujodaros kamienines ląsteles, tokias kaip neuralinės kamieninės ląstelės ir gemalinės kamieninės ląstelės. Be to, šis išradimas taikomas polipeptidams nesutinkamiems gamtoje, kurie turi pakankamą dubliuojančią aminorūgščių seką, lyginant su natūraliai egzistuojančių kamieninių ląstelių faktoriumi.

Šis išradimas taip pat pateikia išskirtą DNR seką, naudojamą išskyrimui ekspresijos prokariotų ar eukariotų ląstelėse-šeimininkėse polipeptidinių produktų, turinčių aminorūgščių sekas, pakankamai panašias lyginant su natūralios kilmės kamieninių ląstelių faktoriaus seka, siekiant aprūpinti pakankamu kraujodaros biologinio aktyvumu natūralios kilmės ląstelių kamienų faktorių. Tokios DNR sekos apima:

a) DNR sekos arba jų komplementarios grandinės, pateiktos Fig.14B, 14C, 15B, 15C, 42 ir 44;

b) DNR sekos, kurios hibridizuotos pagal sekas, nurodytas a) arba jų fragmentus;

c) DNR sekos, išskyrus genetinio kodo išsigimimą, kurios gali hibridizuotis su DNR sekomis, nurodytomis a) ir b).

Be to, susidaro vektoriai, turintys tokias DNR sekas, ir tokiais vektoriais transformuotos ar transfekuotos šeimininko ląstelės. Taip pat šis išradimas apima CSF gavimo būdus, naudojant rekombinantines metodikas ir pažeidimų gydymo būdus. Be to, pateikiamos vaistinės kompozicijos, apimančios CSF ir antikūnus specifiskai surišančius CSF.

Išradimas taip pat apima efektyvų kamieninių ląstelių išskyrimo iš medžiagos, turinčios CSF, metodą, be to, šis metodas apima jonų mainų stadiją, chromatografinį išskyrimą ir/arba išskyrimą skysčių chromatografija.

Šiuo išradimu pateikiamas biologiškai aktyvus aduktas, turintis pailgintą skilimo periodą ir padidintą potencialą veikiant žinduolius, įskaitant CSF, kovalentiškai sujungtą su vandenyje tirpstančiu polimeru, tokiu kaip polietilenglikolis ir polipropilenglikolis, kuriame nurodytas polimeras yra nepakeistas ar pakeistas iš vieno alkilo grupės galo. Kitu šio išradimo aspektu pateikiamas anksčiau aprašyto adukto gavimo būdas, apimantis sąveiką CSF su vandenyje tirpstančiu polimeru, turinčiu mažiausiai vieną galinę reakcijoje dalyvaujančią grupę, o taip pat gauto adukto valymo būdas, norint gauti produktą su pailgintu skilimo cirkuliuojant periodu ir padidintu biologiniu aktyvumu.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 - žinduolių CSF valymas anijonine chromatografija.

Fig.2 - žinduolių CSF valymas gel-filtracine chromatografija

Fig.3 - chromatograma valant žinduolių CSF agliutininą (iš daigintų kviečių) - agarozės kolonėlėje

Fig.4- žinduolių CSF valymas katijonine chromatografija

Fig.5 - C₄ chromatograma valant žinduolių CSF

Fig.6- C₄ frakcijos iš Fig.5 elektroforezė (SDS)-poliakrilamidiniame gelyje (SDS-PAGE) su natriododecilsulfatu

Fig.7 - žinduolių CSF C₄ analitinė C₄ chromatografija

Fig.8 - C₄ frakcijos SDS-PAGE

Fig.9 - išvalyto žinduolių CSF ir deglikozilinto žind. CSF SDS-PAGE

Fig.10 - išvalyto žinduolių CSF C₄ analitinė chromatografija

Fig.11 - parodyta žinduolių CSF faktoriaus aminorūgščių seka, išvesta iš baltymų sekos.

Fig.12 - parodyta: A. Oligonukleotidai žiurkės kamieninių ląstelių faktoriaus komplementariai DNR. B. Oligonukleotidai žmogaus kamieninių ląstelių faktoriaus DNR. C. Universalūs oligonukleotidai

Fig.13 - parodyta: A. Polimerazės ciklinės reakcijos (PCR) sustiprinimo schema žiurkės faktoriaus (CSF) komplementariai DNR. B. Polimerazės ciklinės reakcijos (PCR)sustiprinimo schema žmogaus faktoriaus (CSF) komplementariai DNR.

Fig.14 - parodyta: A. Žiurkės genominės DNR sekos paieškos strategija. B. Nukleino rūgščių seka žiurkės genominei DNR. C. Žiurkės faktoriaus SCF komplementarios DNR nukleino rūgščių seka ir aminorūgščių seka žiurkės baltymo SCF.

Fig.15 - parodyta: A. Sekos paieškos strategija žmogaus genominei DNR. B. Nukleino rūgščių seka žmogaus genominei DNR. C. Žmogaus faktoriaus CSF komplementarios DNR nukleino rūgščių sekos ir žmogaus baltymo CSF aminorūgščių sekos kompozicija.

Fig.16 - parodytas palyginimas aminorūgščių sekos žmogaus, beždžionės, šuns, pelės ir žiurkės SCF baltymo.

Fig.17 - parodyta žinduolių ląstelės ekspresijos vektoriaus V19.8 SCF struktūra.

Fig.18 - parodyta žinduolių CHO ląstelės ekspresijos vektoriaus pDSVE struktūra.

Fig.19 - parodyta E.coli ekspresijos vektoriaus pCFM 1156 struktūra.

Fig.20 - parodyta: A. Žinduolių SCF radioimuninės analizės duomenys. B. Imuno-išsodinto žinduolių CSF SDS-PAGE.

Fig.21 - parodyta žmogaus rekombinantinio CSF Vesterno analizė.

Fig.22 - parodyta žiurkės rekombinantinio CSF Vesterno analizė.

Fig.23 -pateikiama diagrama, iš kurios matyti žiurkės COS-1 ląstelės produkuojamo rekombinantinio SCF faktoriaus veikimas kaulų čiulpų transplantacijai.

Fig.24 - parodytas žiurkės rekombinantinio CSF efektas gydant Stilo pelių makrocitinę anemiją.

Fig.25 - parodytas skaičius periferinių baltųjų kraujo kūnelių (WEC) Stilo pelių, apdorotų žiurkės rekombinantiniu CSF.

Fig.26 - parodytas Stilo pelių, apdorotų žiurkės rekombinantiniu CSF, trombocitų skaičius.

Fig.27 - parodytas Stilo pelių (WEC) diferenciacinis skaičius, apdorojant žiurkės rekombinantiniu SCF¹⁻¹⁶⁴ PEG 25.

Fig.28 - parodytas Stilo pelių limfocitų rinkinys, apdorojant žiurkės rekombinantiniu SCF¹⁻¹⁶⁴ PEG 25.

Fig.29 - parodytas paprastų primatų apdorojimo rekombinantine CSF seka efektas, išaugant periferinių WEC skaičiui.

Fig.30 - parodytas paprastų primatų apdorojimo rekombinantine CSF seka efektas, išaugant hematokritą ir trombocitų skaičiui.

Fig.31 - parodytos fotografijos: A. žmogaus kaulų čiulpų kolonijos, stimuliuotos žmogaus rekombinantiniu SCF¹⁻¹⁶². B. Rait-Gemzo dažytos ląstelės iš kolonijos Fig. 31A.

Fig.32 - parodyti duomenys SDS-PAGE frakcijos iš kolonėlės su S-sefaroze iš Fig.33 chromatogramos.

Fig.33 - pateikiama chromatograma žmogaus rekombinantinio SCF, išskirto iš *E.coli* kolonėlėje su S-sefaroze.

Fig.34 - parodyti duomenys SDS-PAGE frakcijos iš kolonėlės C₄ iš chromatogramos, parodytos Fig.35 : A. su redukuojančiu agentu, B. be redukuojančio agento.

Fig.35 - pateikia chromatograma žmogaus rekombinantinio SCF, išskirto iš *E.coli* kolonėlėje C₄.

Fig.36 - pateikiama chromatograma žiurkės rekombinantinio SCF, išskirto iš CHO kolonėlėje su Q-sefaroze.

Fig.37 - pateikiama chromatograma žiurkės rekombinantinio SCF, išskirto iš CHO kolonėlėje C₄.

Fig.38 - parodyti duomenys SDS-PAGE frakcijos iš C₄ kolonėlės iš chromatogramos parodytos Fig.37.

Fig.39 - parodyti duomenys SDS-PAGE rekombinantinio žiurkės SCF, išskirto iš išvalyto CHO, iki ir po deglikozilinimo.

Fig.40 - parodyta: A. gel-filtracinė chromatograma rekombinantinio žiurkės pegiliruoto SCF¹⁻¹⁶⁴ reakcijos mišinio. B. gel-filtracinė chromatograma rekombinant. žiurkės nemodifikuoto SCF¹⁻¹⁶⁴.

Fig.41 - parodytas žymėto SCF surišimas su šviežiais leukeminiais blastais.

Fig.42 - parodyta žmogaus SCF komplementarios DNR seka, gautos iš fibrosarkomos ląstelių linijos HT1080.

Fig.43 - parodyta autoradiograma ląstelių COS-7, išreiškiančių žmogaus SCF¹⁻²⁴⁸ ir CHO ląstelių, išreiškiančių žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴.

Fig.44 - parodyta žmogaus SCF komplementarios DNR seka, gauta iš pūslinės karcinomos ląstelių linijos 5637.

Fig.45 - parodytas apšvitintų pelių išgyvenimo procento padidėjimas, apdorojus SCF.

Fig.46 - parodytas apšvitintų pelių išgyvenimo procento padidėjimas, po kaulų čiulpų su 5% klubo kaulo transplantacijos ir apdorojimo SCF.

Fig.47 - parodytas apšvitintų pelių išgyvenimo procento padidėjimas po kaulų čiulpų su 0.1 ir 20% klubo kaulo transplantacijos ir apdorojimo SCF.

Daugybė šio išradimo aspektų ir pranašumų akivaizdūs šios biochemijos srities specialistams, peržiūrėjus sekantį detalų aprašymą, kurį papildė praktinio išradimo įgyvendinimo iliustracijos optimaliems variantams šioms dienoms.

Detalus išradimo aprašymas

Šiuo išradimu pateikiami nauji kamieninių ląstelių faktoriai ir DNR sekos, kurios koduoja visus arba dalį tokių SCF faktorių. Čia naudojamas terminas "kamieninių ląstelių faktoriai" arba SCF yra SCF natūralios kilmės (pvz. žmogaus SCF), o taip pat polipeptidai dirbtinės kilmės (t.y. besiskiriantys nuo randamų gamtoje), kurie turi aminorūgščių sekas ir glikozilinimą pakankamai panašius lyginant su tokiais natūralios kilmės kamieninių ląstelių faktoriais, kurie apsprendžia gamtinio kraujodaros kamieninio faktoriaus biologinį aktyvumą. Kamieninių ląstelių faktorius pasireiškia sugebėjimu stimuliuoti ankstyvųjų kraujodaros pirmtakų augimą, kurie gali subręsti ir virsti eritroidais, megakariocitais, limfocitais ir makrofaginėmis ląstelėmis. Žinduolių gydymas

CSF faktoriumi įgalina absoliutų kraujodaros ląstelių, tiek mieloidinių, tiek ir limfoidinių, padidėjimą. Viena iš kamieninių ląstelių kritinių charakteristikų yra jų sugebėjimas diferencijuotis į mieloidines ir limfoidines ląsteles (Waisman, Science, 1988, 241 t., 58-62 psl.). Veikiant Stilo (8B pavyzdys) peles rekombinantiniu žiurkių faktoriumi SCF, pastebimas granulocitų, monocitų, eritrocitų, limfocitų ir trombocitų padidėjimas. Veikiant paprastus primatus rekombinantiniu žmogaus SCF faktoriumi, pastebimas mieloidinių ir limfoidinių ląstelių padidėjimas (pavyzdys 8C).

Egzistuoja embrioninė ekspresija SCF ląstelėmis migraciniuose takuose ir chomigoviniuose melanoblastų, gemalinių ląstelių kraujodaros ląstelių centruose, galvos smegenyse ir nugaros smegenų chordoje.

Ankstyvosios pirminės kraujodaros ląstelės kaupiasi žinduolių kaulų čiulpuose, kuriuos veikia 5-fluoruracilas (5-FU). Chemoterapinis medikamentas 5-FU selektyviai išsekina vėlesnius kraujodaros pirmtakus. SCF faktorius yra aktyvus kaulų čiulpams po apdorojimo su 5-FU.

SCF biologinis aktyvumas ir pasiskirstymo audiniuose charakteris rodo jo pagrindinį vaidmenį embriogenezėje ir kraujodaroje, o taip pat potencialą gydant įvairius kamieninių ląstelių trūkumus.

Šis išradimas pateikia DNR sekas, kurios apjungia: kodonų, "pageidaujamų" ekspresijai išrinktų šeimininkų-nežinduolių įjungimo; skaldymo vietos pateikimą veikiant restrikcinės endonukleazės fermentams; aprūpinimą papildomomis pradinės, terminalinės ir tarpinės DNR sekomis, kurios palengvina lengvai ekspresuojamų vektorių konstravimą. Šis išradimas taip pat pateikia DNR sekas, kurios koduoja polipeptidų analogus ar išskiriamą SCF, kuris skiriasi nuo randamų gamtoje formų identiškumu ar keletu aminorūgščių liekanų (pvz. deleciniai analogai, turintys ne visas liekanas, skirtas SCF; pakeitimo analogai, kuriuose viena arba keletas specifinių liekanų pakeistos kitomis liekanomis; adityviniai analogai, kuriuose viena arba keletas amino rūgščių liekanų pridedama prie terminalinės arba medialinės polipeptido dalies) ir kurie pasižymi kai kuriomis arba visomis gamtoje sutinkamomis savybėmis. Šis išradimas ypač taikomas DNR sekoms, koduojančioms visą neapdorotą aminorūgščių seką ilgį, o taip pat DNR sekas, koduojančias apdorotą SCF formą.

Šio išradimo naujos DNR sekos apima sekas, naudingas esant išskirtai ekspresijai prokariotinėse ar eukariotinėse polipeptidinių produktų šeimininkų ląstelėse, turinčiose mažiausiai dalį pirminės struktūrinės konformacijos ir vieną arba keletą gamtinės kilmės SCF biologinių savybių. Specifiškai, DNR sekos apjungia: a) DNR sekas, pateiktas Fig.14B, 14C, 15B, 15C, 42 ir 44, arba jų komplementarias spirales; b) sekas, kurios hibridizuotos (hibridizacijos sąlygomis, aprašytomis 3 pavyzdyje, arba dar griežtesnėse sąlygose) su DNR sekomis Fig.14B, 14C, 15B, 15C, 42 ar 44 arba jų fragmentais; ir c) DNR sekas, kurios, išskyrus genetinio kodo degeneraciją, gali hibridizuotis prie DNR sekų Fig.14B, 14C, 15B, 15C, 42 ar 44. Specifiškai apimtos dalyse b) ir c) yra genominės DNR sekos, koduojančios SCF formos alelinius variantus ir/arba koduojančios SCF iš kitų žinduolių rūšių, ir gautos DNR sekos, koduojančios SCF, šio faktoriaus fragmentai ir jo analogai. DNR sekos gali įjungti kodonus, palengvinančius informacinės RNR transkripciją ir translaciją mikrobiniuose šeimininkuose. Tokios gautos sekos gali būti lengvai sukonstruotos pagal Altono ir kt. metodus, publikuotus paraiškoje PST WO 83/04053.

Remiantis kitais šio išradimo aspektais, čia aprašytos DNR sekos, kurios koduoja polipeptidus, turinčius SCF aktyvumą, yra vertingos dėl informacijos, kurią jos suteikia apie žinduolių baltymų aminorūgščių seką, kuri iki šiol buvo nepasiekiamo. Šios DNR sekos taip pat yra vertingos kaip produktai, naudingi esant didelių mastelių SCF sintezei, padedant daugybei rekombinantinių metodikų. Kitais žodžiais tariant, šiuo išradimu pateikiamos DNR sekos naudojamos dirbant su naujais ir naudingais virusiniais ir cirkuliniais DNR plazmidės vektoriais, naujomis ir naudingomis transformuotomis ir transfekuotomis prokariotinėmis ir eukariotinėmis šeimininkų ląstelėmis (įskaitant bakterijų ir mielių ląsteles ir kultūroje auginamas žinduolių ląsteles), ir naujais ir naudingais tokių ląstelių-šeimininkų kultivavimo metodais, tinkamų SCF ekspresijai ir šiam faktoriui giminingiems produktams.

Šio išradimo DNR sekos taip pat yra tinkamos panaudojant jas kaip žymėtus pavyzdžius izoliuojant žmogaus genominę DNR, koduojančią SCF ir kitus genus giminingiems baltymams, o taip pat komplementarios DNR sekoms ir kitų žinduolių rūšių genomei DNR.

DNR sekos taip pat gali būti panaudojamos įvairiuose alternatyviuose baltymų sintezės būduose (pvz., vabzdžių ląstelėse) arba žmogaus ir kitų žinduolių genetinės terapijos atveju. Manoma, kad šio išradimo DNR sekos gali būti panaudojamos dirbant su transgeninėmis žinduolių rūšimis, kurios galima panaudoti kaip eukariotinius "šeimininkus" gaminant SCF faktorių ir jo produktus dideliais kiekiais. Žr. Palmitero ir kitų bendrame straipsnyje žurnale Science 1983. 222 t., 809-814 psl.

Šis išradimas pateikia išskirtą ir išvalytą gamtinės kilmės SCF (t.y. išvalytą iš gamtinio ir padarytą taip, kad pirminė, antrinė ir tretinė glikozilimo konformacija ir charakteris būtų identiški natūralios kilmės medžiagai), o taip pat dirbtinės kilmės polipeptidus, turinčius pirminę struktūrinę konformaciją (t.y. nepertraukiamą aminorūgščių liekanų seką) ir glikozilimą, pakankamai duplikatų natūralios kilmės kamieninių ląstelių faktoriui, tam kad jie pasižymėtų natūralios kilmės SCF faktoriaus kraujodaros biologiniu aktyvumu. Tokie polipeptidai apjungia darinius ir analogus.

Ypač siūlomame SCF variante, jis charakterizuojamas kaip prokarioto ar eukarioto šeimininko ekspresijos (pvz., bakterijų, mielių, aukštesniųjų augalų, vabzdžių ir žinduolių ląstelių kultūroje) DNR egzogeninių sekų produktas, gautas klonuojant genominę ar komplementarią DNR arba genetinės sintezės būdu. T.y., siūlomame SCF variante jis charakterizuojamas kaip "rekombinantinis SCF". Ekspresijos produktai tipiškuose mielių (*ass agomuse cerevisiae*) ar prokariotų (pvz., *E.coli*) ląstelėse-šeimininkėse laisvi nuo susijungimo su kokiais nors žinduolių baltymais. Ekspresijos produktai stuburinių (pvz., žinduolių, besiskiriančių nuo žmogaus (COS ir CHO), ir paukščių) ląstelėse laisvi nuo susijungimo su kokiais nors žmogaus baltymais. Priklausomai nuo panaudojamo šeimininko, šio išradimo polipeptidai gali būti glikozilinti žinduolių angliavandeniais arba kitais eukariotų angliavandeniais, arba gali būti neglikozilinti. Ląstelė-šeimininkė gali būti pakeičiama panaudojant metodikas, tokias kaip aprašytos Lii ir kitų darbe, J.Biol.Chem. 1989, 264 t., 13848 psl., kuris įvestas kaip išnaša. Be to, išradimo polipeptidai gali įtraukti išėjimo metionino aminorūgščių liekanas (l-padėtyje).

Papildomai gamtinės kilmės SCF alelinėms formoms, šis išradimas taip pat apima kitus SCF produktus, tokius kaip SCF peptidinius analogus. Tokie analogai įjungia SCF fragmentus. Naudojant anksčiau paminėtos Altono ir kitų (WO 83/04053) paraiškos

metodikas, galima lengvai sukonstruoti ir gauti genus, kurie koduoja ekspresiją mikrobinių, turinčių pirminę konformaciją, polipeptidų, besiskiriantys nuo čia aptariamų identiškumo terminais arba išsidėstymu vienos ar kelių liekanų (pvz., pakeitimai, terminaliniai ir tarpiniai prijungimai ir delecija). Alternatyviai, komplementarios DNR ir genomo genų modifikacijos gali būti lengvai įgyvendinamos su gerai žinomų lokališkai nukreiptų mutagenezės metodikų pagalba ir naudojamos SCF degeneruotiems analogams ir dariniams. Tokie produktai dalyvauja mažiausiai viena iš biologinių SCF savybių, bet gali skirtis nuo kitų. Kaip pavyzdžiai, išradimo produktai gali apjungti sutrumpintus produktus, pvz., delecijomis arba tuos, kurie stabilesni hidrolizei (ir todėl gali turėti labiau išreikštų ar ilgaamžiškesnių efektų, negu natūralios kilmės produktai); arba tie, kurie pakeisti pašalinimui ar pridėjimui vieni ar kelių potencialių centrų O-glikozilinimui ir/arba N-glikozilinimui, arba tie, kurie turi vieną ar keletą cisteino liekanų, pašalintų arba pakeistų, pvz., alanino ar serino liekanomis ir potencialiai lengviau aktyvioje formoje išsiskiria iš mikrobinių sistemų; arba tie, kurie turi vieną ar kelias tirozino liekanas, pakeistas fenilalaninu, ir lengviau ar sunkiau susiriša su baltymais taikinio ar receptoriais ant taikinio ląstelių. Be to, išradimas apima polipeptidinius fragmentus, dublikuojančius tik dalį nepertraukiamos amino rūgščių sekos ar antrinę SCF vidaus informaciją, ir šie fragmentai gali pasižymėti vienomis SCF savybėmis (pvz., receptoriaus ryšiu), o ne kitomis (pvz., ankstyvųjų kraujodaros ląstelių augimo aktyvumu). Užtenka paminėti, kad aktyvumas nėra būtinas kokiam nors vienam ar keliems išradimo produktams, bet pasižymi terapiniu naudingumu (žr., Weiland ir kiti, Blood, 1982, 44 t., 173-175 psl.), arba nauda kituose kontekstuose, tokiuose kaip SCF antagonizmo analizės. Konkurentiniai antagonistai gali būti visai naudingi, pvz., SCF perprodukcijos atveju arba žmogaus leukemijos atvejais, kada piktybinės ląstelės perprodukuoja receptorių SCF, ką parodo SCF receptorių perprodukcija leukeminiuose blastuose (13 pvz.).

Išradimo panaudojamais polipeptidų analogais yra pranešimai apie imunines savybes sintetinių peptidų, kurie iš esmės dubliuoja aminorūgščių seką, išlikusią natūralios prigimties baltymuose, glikoproteinuose ir nukleoproteinuose. Konkrečiau buvo parodyta, kad santykinai mažo molekulinio svorio polipeptidai dalyvauja imuninėse fiziologiškai svarbių baltymų reakcijose, tokių kaip virusiniai antigenai,

polipeptidiniai hormonai ir t.t. Tokiose imuninėse reakcijose polipeptidai apima: specifinių antikūnų susidarymo provokacijas imunologiškai aktyviuose gyvūnuose [(Lerner ir kt., Cell, 23, 309-310 (1981); Ross ir kt., Nature, 294, 654-656 (1981); Walter ir kt., Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 77, 5197-5200 (1980); Lerner ir kt., Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 78, 4882-4886 (1981); Wong ir kt., Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 79, 5322-5326 (1982); Baron ir kt., Cell, 28, 395-404 (1982); Dressman ir kt., Nature, 295, 185-160 (1982); Lerner, Sci.Amer., 248, 66-74 (1983). Žr. t.p. Kaiser ir kt., Sci. 223, 249-255 (1984)] reaguojančių į sintetinių baltymų, kurie artimai atkartoja peptidinių hormonų antrinę struktūrą, bet negali atkartoti jų pirminės struktūrinės konformacijos, biologines ir imunologines savybes.

Be to, šis išradimas apima tų polipeptidų klasę, kurie užkoduoti DNR dalimis, komplementariai ir baltymus koduojančia spirale žmogaus k-RNR ar genominėmis DNR SCF sekomis, t.y. "komplementariai invertuotais baltymais", kaip aprašyta (Tramontano ir kt., Nuc.Acid Res., 1984, 12 t., 5049-5059 psl.).

Šiuo išradimu pateikiami SCF polipeptidai apima, bet neapsiriboja SCF faktorius: 1-148, 1-162, 1-164, 1-165, 1-183 (Fig.15C); 1-185, 1-188, 1-189 ir 1-248 (Fig.42); ir 1-157, 1-160, 1-161 ir 1-220 (Fig.44).

SCF faktorius gali būti išvalytas naudojant metodikas, kurios yra žinomos specialistams šioje biochemijos srityje. Tyrimo objektas apjungia SCF valymo metodus iš medžiagos, turinčios SCF, tokios kaip kondicinės terpės ar žmogaus šlapimo, plazmos, be kita ko metodus apima vieną ar kelias stadijas, tokias kaip: medžiagų, turinčių SCF, gryninimas jonų mainų chromatografija (katijonine ar anijonine chromatografija); medžiagų, turinčių SCF, gryninimas skysčių chromatografija, naudojant imobilizuojančias C4 ar C6 dervas; gryninimas skysčių chromatografija panaudojant imobilizuojantį lektiną, t.y. SCF pririša prie imobilizuojančio lektino ir eliuuoja naudojant cukrus, kurie yra konkurentai tokiam "pririšimui". Šių metodų panaudojimo detalės paaiškės iš SCF valymo aprašymo pateikto 1, 10 ir 11 pavyzdžiuose. Metodikos, aprašytos 2 pvz. JAV patente 4667 016 (Lay ir kt.), įtrauktos į aprašymą su išnaša, taip pat yra naudojamos, valant kamieninių ląstelių faktorių.

SCF izoformos išskiriamos naudojant standartines metodikas, tokias kaip metodikos, išdėstytos JAV paraiškoje reg. Nr. 421444 1989 spalio 13, pavadintoje "Eritrodarinių izoformos" (bendras valdymas), čia įtraukta kaip išnaša.

Šis išradimas taip pat pateikia farmacines kompozicijas, apimančias terapiškai efektyvius polipeptidinių produktų kiekius kartu su atitinkamais tirpikliais, konservantais, tirpinamais priedais, emulgikliais, promotoriais ir/arba nešikliais, naudojamais SCF terapijoje. Čia naudojamas terminas "terapiškai efektyvus kiekis" yra toks kiekis, kuris užtikrina terapinį efektą esant tam tikrai būklei ir paskyrimo režimui. Tokios kompozicijos yra skysčiai ar liofilizuotos formos arba kitaip išdžiovintos pagal receptūrą, ir įjungia tirpiklius su skirtingo turinio buferiais (pvz., Tris-HCl, acetatas, fosfatas), pH ir jonų jėgos reguliatoriai, tokie kaip albuminas ar želatina, tam kad sutrukdyti adsorbciją paviršiuje), detergentai (pvz., Tween-20, Tween-80, Pluronic F68, skrandžio rūgščių druskas), tirpinančius agentus (pvz., glicerinas, polietilenglikolis), antioksidantus (pvz., askorbino rūgštį, natrio metabsulfitą), konservantus (pvz., tiomersalį, benzilo alkoholį, parabeną), tūrio medžiagas ar koncentracijos modifikatorius (pvz., laktozė, manitolas), polimerų, tokių kaip polietilenglikolis, kovalentiškai pririštų prie baltymų (aprašyta žemiau, 12 pavyzdyje), komplekso sudarymas su metalo jonais ar preparato įvedimas į/arba ant polimerinių medžiagų granuliuotų preparatų, tokių kaip pieno rūgštis, poliglikolio rūgštis, hidrogeliai ir kt., ar liposomos, mikroemulsijos, miceliai, vienasluoksniai ar daugiasluoksniai nešikliai, eritrocitų "šešėliai" ar sferoplastai. Tokios kompozicijos gali turėti įtakos fiziniam būviui, tirpumui, išsiskyrimo gyvame organizme stabilumo laipsniui ir SCF buvimo gyvam organizme laipsniui. Kompozicijos pasirinkimas priklausys nuo baltymų, turinčių SCF aktyvumą, fizinių ir cheminių savybių. Pvz., produktas, gautas iš membranoje-surištos formos SCF, gali reikalaus receptūros, turinčios detergentų. Kompozicijos su reguliuojamu ar pastoviu išskyrimu turi lipofilinių formų receptūrą (pvz., riebiosios rūgštys, vašakai, aliejai). Taip pat išradimas apima granuliuotas kompozicijas, padengtas polimerais (pvz., poloksameriais ar poloksaminais) ir SCF, surištas su antikūnais, nukreiptais prieš audinių specifinius receptorius, ligandus ar antigenus ar surištus su ligandais audinyje specifiniais receptoriais. Kiti išradimo įgyvendinimo variantai apima granuliuotas formas, apsauginius apvalkalus, proteazių inhibitorius ar

prasiskverbimo sustiprintojus įvairiems įvedimo būdams, įskaitant parenteralinį, per kvėpavimo takus, per nosį ar per burną.

Išradimas taip pat apima vieną ar kelis papildomus kraujodaros faktorius, tokius kaip EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IGF-1 ar LIF (leukemijos inhibicijos faktorius).

Šio išradimo polipeptidai gali būti "žymėta" priemone sujungimui su detekicine žymėta medžiaga (pvz., su Jodo-125 radioaktyvia žyme ar biotiniliniu), siekiant pateikti reagentus, tinkamus detekcijai ir kiekybiniam SCF ar jo ląstelių, turinčių receptorius, įvertinimui tvirtuose audiniuose ir skystuose pavyzdžiuose, tokiuose kaip kraujas ar šlapimas.

Biotinilintas SCF naudojamas kartu su imobilizuotu streptavidinu siekiant "praplauti" leukeminius blastus iš kaulų čiulpų autologinėje kaulų čiulpų transplantacijoje. SCF toksiniai konjugatai, tokie kaip ricinas (Ur, Prog Clin.Biol.Res. 1989, 288 t., 403-412 psl.), difteria-toksinas (Moolten, J. Natl. Con. Inst. 1975, 55t., 473-477) ir radioizotopai naudojami anti-neoplastinėje terapijoje (13 pvz.) ar sudarant kaulų čiulpų transplantacijoje kondicinį režimą.

Išradimo nukleino rūgščių produktai naudingi, jeigu pažymėti detekcinėmis žymėmis (tokiomis kaip radiožymės ir neizotopinės žymės, tokios kaip biotinas) ir panaudojami hibridizacijos procese, žmogaus SCF faktoriaus geno vietos nustatymui ir/arba bet kokio giminingo geno vietos nustatymui chromosominiame žemėlapyje. Jie taip pat panaudojami žmogaus SCF geno pažeidimų nustatyme genetiniame lygyje ir naudojami kaip genetiniai markeriai kaimyninių genų identifikacijai ir jų pažeidimams nustatyti. Žmogaus SCF genas koduojamas ant 12 chromosomos, o pelių SCF ant 10 chromosomos žemėlapių 1 aplinkoje.

SCF faktorius naudojamas pats vienas arba kartu su kitomis terapijomis gydant eilę kraujodaros pažeidimų. SCF galima panaudoti vieną arba su vienu ar keliais kraujodaros faktorių, tokiais kaip EPO, G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-1-IL-11, IGF-1 ar IIF, gydant kraujodaros pažeidimus.

Egzistuoja kamieninių ląstelių pažeidimo grupė, kuri charakterizuojama funkcinės kaulų čiulpų masės sumažėjimu, kurią iššaukia toksiniai, radiaciniai ar imunologiniai pažeidimai ir kurie gali būti išgydyti su SCF. Aplatinė anemija yra taip pat kamieninių

ląstelių pažeidimas, ir šiuo atveju kraujodaros audiniai pakeičiami riebaliniais, ir pancitopenija. SCF sustiprina kraujodaros proliferaciją ir yra naudinga gydant aplastinę anemiją (8B pvz.). Kaip žmogaus aplastinės anemijos modelį panaudoja Stilo peles (Jons, Exp.Hematol. 1983, 11t., 571-580 psl.). Buvo gauti perspektyvūs rezultatai panaudojus aplastinės anemijos gydymui giminingą citokiną, GM-SCF (Antin ir kt., Blood, 1987, 70 t., 129a psl.). Paroksizmalinė nakturalinė hemoglobinurija (PNG) yra kamieninių ląstelių pažeidimas ir charakterizuojama defektyvių trombocitų ir granuliocitų, o taip pat nenormalių eritrocitų, susidarymu.

Egzistuoja daugybė susirgimų, kurie gali būti išgydomi SCF faktoriumi. Tai apima: mielofibrozę, mielosklerozę, osteopetrozę, metastatinę karcinomą, ūmią leukemiją, daugybinę mielomą, Chodžkinso ligą, limfomą, Gašė ligą, Niemano-Piko susirgimą, Letterere-Sivo ligą, refraktorinę eritroblastinę anemiją, di Guglielmo sindromą, kongestinę splenomegaliją, Kala azarą, sarkoidozę, pirminę blužnies pancitopeniją, miliarinę tuberkuliozę, išbėrimų grybelinius susirgimus, fulminacinę senticemiją, maliariją, vitamino B₁₂ ir folinės rūgšties deficitą, piridoksino deficitą, Daimondo Blakfano anemiją, hipopigmentinius pažeidimus, tokius kaip piebaldizmas, vitiligo. SCF eritroidinės, megakariocitinės ir granuliocitinės stimuliuojančios savybės pailiustruotos 8B ir 8C pvz.

Kraujodaros kamieninių ląstelių, tokių kaip pirmosios gemalinės ląstelės, melanocitai, išsivystę iš nervinės skiauterės, komisūraliniai aksonai, išsivystę iš dorsalinės nugaros chordos, normalių mezonefritinių ir metanefritinių kepenų kanalėlių kriptų ląstelės, ir apgaubiančių išaugų augimo sustiprėjimas pagerina jų būklę, kai įvyksta audinių pažeidimas šiose vietose. SCF naudojamas neurologinių pažeidimų gydymui ir yra nervo ląstelių augimo faktorius. SCF naudojamas apvaisinimo ne organizme metodikose ir nevaisingumo atvejais. SCF naudingas gydant žarnyno pažeidimus, atsiradusius dėl spinduliavimo ar chemoterapijos.

Yra mieloproliferacinių kamieninių ląstelių pažeidimai, tokie kaip policitemija, chroninė mielogenozinė leukemija, mieloidinė mataplazija, pirminė trombocitemija ir ūminės leukemijos, kurios gali būti gydomos naudojant SCF, anti-SCF antikūnus ar SCF-toksinų konjugatus.

Yra daugybė atvejų, kur užfiksuota išaugusi leukeminių ląstelių proliferacija paveikus kraujodaros ląstelių augimo faktoriams G-SCF, GM-SCF ir IL-3 (Delvel ir kt., 1988, 72 t., 1944-1949 psl.). Kadangi daugelio chemoterapinių medikamentų sėkmė priklauso nuo to, kad neoplatinės ląstelės daug aktyviau praeina vystymosi ciklą, negu normalios ląstelės, SCF, kaip toks, ar kartu su kitais faktoriais, veikia kaip augimo faktorius neoplatinėms ląstelėms ir padidina jų jautrumą toksiniams chemoterapinių medikamentų efektams. SCF receptorių padidinta ekspresija leukeminimas blastams parodyta 13 pvz.

Atliktas eilės rekombinantinių kraujodaros faktorių tyrimas, nustatant jų sugebėjimą sumažinti kritinį leukocitų sumažėjimą, įvykstantį dėl chemoterapijos ir radiacinės chemoterapijos. Nors šie faktoriai yra pakankamai naudingi šioje aplinkoje, egzistuoja ankstyvasis kraujodaros atsiskyrimas, kuris pažeistas ypač spinduliavimu, turi būti pakartotinai atnaujintas anksčiau, negu šie vėlesni augimo faktoriai pasireikš optimaliu veikimu. Vieno ar kartu su šiais faktoriais SCF naudojimas papildomai sumažina ar eliminuoja kritinį leukocitų ir trombocitų sumažėjimą, iššauktą chemoterapinio ar radiacinio poveikio. Be to, SCF įgalina padidinti antineoplatinio ar apšvietimo režimo dozę (19 pvz.).

SCF yra naudingas ankstyvųjų kraujodaros pirmtakų išplėtimui singeninėje, alogeninėje ar antologinėje kaulų čiulpų transplantacijoje. Buvo parodyta, kad kraujodaros augimo faktorių panaudojimas pratęsia neutrofilinio audinio atsistatymą po transplantacijos (Donahwu ir kt. Nature, 1986, 321 t., 872-875 psl. ir Welt ir kt. J.Exp.Med. 1987, 165 t., 941-948 psl.). Kaulų čiulpų transplantacijai naudojami tokie trys scenarijai, vieni ar kartu: a) donoras apdorojamas vienu SCF ar kartu su kitais kraujodaros faktoriais iki kaulų čiulpų išsiurbimo ar periferinės kraujo leukoferozės tam, kad padidinti ląstelių, tinkančių transplantacijai, kiekį; b) kaulų čiulpai apdorojami ne organizme tam, kad juos aktyvuoti ar padidinti ląstelių skaičių iki transplantacijos; ir c) recipientas apdorojamas siekiant sustiprinti donoro kaulų čiulpų priėmimą.

SCF faktorius naudojamas kraujodaros kamieninių ląstelių efektyvumo genetinėje terapijoje, transfekcijos pagrindu (arba infekcijos su retrovirusiniu vektoriumi) sustiprinimui. SCF galima kultivuoti ir multiplikuoti ankstyvasias kraujodaros pirmtakų ląsteles, kurios tinkamos transfekcijai. Kultūra gali būti padaroma su vienu SCF ar kartu

su IL-6, IL-3 arba ir su tuo ir kitu. Po transfekcijos šios ląstelės supilamos į kaulų čiulpų transplantus pacientams, nukentėjusiems dėl genetinių pažeidimų (Lim, Prs, Nali, Acad. Sci. 1989, 86 t., 8892-8896 psl.). Genai, kurie naudojami gydant genetinius pažeidimus yra: adenzin-deaminazė, glikocerebrozidazė, hemoglobinas ir cistinė fibriozė.

SCF naudojamas gydant imunodeficitą (AIDS) ar sunkias kombinuotas būkles, kaip toks arba kartu su kitais faktoriais, tokiais kaip IL-7 (žr. 14 pvz.). Tokio efekto iliustracija yra SCF terapijos sugebėjimas padidinti absoliutų cirkuliuojančių limfocitų T-helperių (CD4, OKT4) lygį. Šios ląstelės yra pirmi ląsteliniai taikiniai žmogaus imunodeficito viruso (HIV), privedančio prie imunodeficito būklės pacientus su AIDS (Montanier knygoje Nima T-Ceff Leukemia a/Lumphoma virus, red. Gallo, Cold spring harbor, New Yor, 1984 369-370 psl.). Papildomai, SCF naudojamas kaip priešnuodis mielosupresiniam anti-HIV medikamentų, tokių kaip azidotimedinas (AZD), veikimui (Gogi, Life Sci. 1989, 45 t., Nr 4).

SCF naudojamas kraujodaros sugebėjimams atsistatyti po stipraus nukraujavimo, sustiprinimui.

Gyvo organizmo apdorojimas SCF naudojamas kaip reimunizacija imuninės sistemos kovoje su neoplazija (vėžiu). Terapeutinės naudos tiesioginio imuninės funkcijos sustiprinimo su neseniai klonuotu citokinu (IL-2) pavyzdys aprašytas (Rozenbergo ir kt., N.Eng.J.Med., 1987, 313 t., 1485).

SCF įvedimas su kitais agentais, tokiais kaip vienu ar keliais kraujodaros faktoriais, vykdomas palaipsniui arba iš karto. Iki apdorojimo SCF, padidinamas pirmtakų kiekis, kas įgalina terminalinį veikiantį faktorių, tokį kaip C-CSF ar EPO. Įvedimo būdas gali būti intraveninis, į pilvą, po oda ar į raumenis.

Šis išradimas taip pat apima antikūnus specifiskai surišančius kamieninių ląstelių faktorių. Žemiau 7 pvz. aprašoma polikloninių antikūnų gamyba. Papildomas išradimo įgyvendinimas yra monokloniniai antikūnai, specifiskai surišantys SCF (žr.20 pvz.). Skirtingai nuo tradicinių (polikloninių) antikūnų preparatų, kurie paprastai apima įvairius antikūnus, nukreiptus prieš įvairius determinantus (epitopus), kiekvienas monokloninis antikūnas nukreiptas prieš vienintelį determinuotą antigeną. Monokloniniai antikūnai naudojami pagerinti diagnostinių ir analitinių metodų selekcijai ir specifiskumui,

naudojant antigeno-antikūno surišimą. Be to, jie naudojami neutralizacijai ar SCF pašalinimui iš plazmos. Antras monokloninių antikūnų pranašumas yra tas, kad jie gali būti susintetinti naudojant hibridines ląsteles kultūroje, neužterštoje kitais imunoglobulinais. Monokloniniai antikūnai gali būti paruošiami iš kultivuotų hibridomos ląstelių nuosėdų skysčio arba iš ascitų, indukuotų pelių pilvo ertmėje hibridominių ląstelių inokuliatu. Ši hibridominė metodika aprašyta pirmiausiai Kelero ir Milšteino (Eug.J.Immun. 1976. 6 t., 511-519 psl.), plačiai buvo naudojama hibridinėms ląstelių linijoms, kurios išskiria didelės koncentracijos antikūnius prieš daugybę specifinių antigenų, gamybai.

Sekantys pavyzdžiai taikomi išradimo pilnesnei iliustracijai, tačiau neapribojant išradimo apimties.

1 pavyzdys.

Kamieninių ląstelių, gautų iš Bufalo žiurkės kepenų ląstelių kondicinės terpės, faktoriaus valymas/charakterizavimas.

A. Biologiniai bandymai ne organizme.

1. HPP-SCF bandymas

Egzistuoja daugybė biologinių aktyvumų, kurie gali būti priskirti natūraliam žiurkės SCF faktoriui, o taip pat rekombinantiniam žiurkės baltymui SCF. Vienas iš tokių aktyvumų yra jo poveikis ankstyvosioms kraujodaros ląstelėms. Šis aktyvumas gali būti išmatuotas analizuojant ląsteles, kurios sudaro kolonijas su aukštu dauginimosi potencialu (HPP-SCF) (Scebo ir kt., cit. aukščiau, 1988). Faktorių efektų ankstyvosiose kraujodaros ląstelėse tyrimui, HPP-SCF sistemoje, naudojami pelių kaulų čiulpai, paimti iš gyvūnų praėjus dviem paroms po apdorojimo 5-fluoruracilu (5-FU). Chemoterapinis medikamentas 5-FU selektyviaialina vėlesnius kraujodaros pirmtakus, dėl ko galima ankstyvųjų pirmtakų ląstelių detekcija ir faktoriai, kurie pasižymi tokių ląstelių veikimu. Žiurkės SCF užneša ant pusiau kietų agarizuotų kultūrų esant CF-1 ar IL-6. Agarizuotos kultūros turi pilną MakKoisio terpę (D1BCO), 30% jaučio serumo, 0.3% agaro ir $2 \cdot 10^5$ /ml kaulų čiulpų ląstelių. Pilna MakKoisio terpė susideda iš: 1xMakKoisio terpė, papildyta 0.1mM piruvato, 0.24x būtinomis aminorūgštimis, 0.24x nebūtinomis aminorūgštimis, 0.027% natrio bikarbonatu, 0.24x vitaminais, 0.72 mM glutaminu, 25

$\mu\text{g/ml}$ serinu ir $12 \mu\text{g/ml}$ L-asparaginu. Kaulų čiulpų ląstelės buvo gautos iš Balb/c pelių, kurioms buvo daromos 150 mg/kg 5-fluoruracilo injekcijos. Kaulus išėmė praėjus 2 paroms po apdorojimo 5-FU, ir iš jų išplovė kaulų čiulpus. Raudonos kraujuotos ląstelės iki patalpinimo ant plokštelių, buvo lizuojamos raudonųjų kraujo kūnelių lizavimo reagentu (firma Bekton Dikenson). Tiriamąją medžiagą patalpino į 30 mm lėkšteles su klampiu mišiniu. Po 14 parų skaičiavo kolonijas (didesnes kaip 1 mm diametro), kurios turi tūkstančius ląstelių. Šis bandymas buvo naudotas gryninant natūralų, gaminamą žinduolių, žiurkės SCF faktorių.

Tipiniu tyrimo atveju žiurkės SCF iššaukia proliferaciją maždaug 50 HPP-CSF/200000 ląstelių. Žiurkės SCF pasižymi sinergetiniu veikimu pelių kaulų čiulpų ląstelėms, apdorotoms 5-FU; HPP-SCF kolonijos negalėjo susiformuoti esant vieninteliams faktoriams, tačiau kartu su SCF ir SCF-1, ir IL-6 šiame bandyme turėjo aktyvumą.

2. MC/9 tyrimas

Kitas naudingas tiek gamtinės, tiek rekombinantinės kilmės žiurkės SCF biologinis aktyvumas yra sugebėjimas iššaukti pelių vaisinių ląstelių linijos, priklausančios nuo IL-4, MC/9 (ATCC CRL 8306), proliferaciją. MC/9 ląstelės buvo kultivuotos su IL-4 šaltiniu, pagal protokolą ATCC CRL 8306. Šiame biologiniame bandyme naudojama terpė buvo RPML 1640, 4% jaučio serumo, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ 2-merkaptoetanolio ir $1 \times$ glutamin-penstrap. MC/9 ląstelės greitai dauginosi paveikus SCG, nereikalaudamos kitų augimo faktorių. Ši proliferacija išmatuojama pirmiausiai ląsteles kultivuojant 24 val. be augimo faktoriaus, po to esant po 5000 ląstelių kiekvienoje iš 96 plokštelių duobučių ir su tiriamuoju pavyzdžiu kultivuojant 48 val., purtant 4 val. su $0.5 \text{ } ^3\text{H}$ -timidinu (santykinis aktyvumas 20 kiuri/mmol). Po to tirpalą išpylė ant stiklo pluošto filtro ir po to išmatavo specifinį radioaktyvumą. Šis bandymas buvo naudojamas valant žiurkės SCF, gautą iš žinduolių ląstelių po ACA 54 gel-filtracijos stadijos, žr. šio pavyzdžio 2 skyrių. Paprastai, SCF iššaukia 4-10 kartinį CPM augimą lyginant su fonu.

3. CFU-GM

Žinduolių išvalyto SCF, tiek gamtinės kilmės tiek rekombinantinio, veikimas nepriklausomai nuo trukdančių faktorių, stimuliuojančių kolonijas (CSFs), buvo įvertinama ant normalių neišsekintų pelės kaulų čiulpų. SCF veikimo ant normalių kaulų čiulpų bandymui buvo naudotas CFU-GM (Broksmeer ir kt., Exp. Hemat. 1977 5 t., 87 ps). Trumpiau, bendras kaulų čiulpų ląstelių kiekis po raudonųjų kraujo kūnelių lizavimo patalpinamas ant pusiau kietos agarizuotos kultūros, turinčios tiramąją medžiagą. Po 10 parų, skaičiavo kolonijų kiekį, turinčių klasterius iš daugiau kaip 40 ląstelių. Agarizuotos kultūros gali būti išdžiovintos ant stiklinių plokštelių, ir ląstelių morfologija gali būti nustatoma su specialiais histologiniais dažais.

Ant normalių pelių kaulų čiulpų išvalytas žinduolių žiurkių SCF buvo labai potencialus SCF, stimuliuojantis kolonijų, turinčių nesubrendusių ląstelių, neutrofilų, makrofagų, eozinofilų ir megakariocitų augimą, nereikalaujant kitų faktorių. Iš 200 tūkst. ląstelių daugiau kaip 100 tokių kolonijų auga 10 parų laikotarpyje. Kaip žiurkių, taip ir žmogaus rekombinantinis SCF faktorius stimuliuoja eritroidinių ląstelių produkciją, kartu su EPO, žr. 9 pvz.

B. Kondicinė terpė

Bufalo žiurkės (BRI), iš Amerikos tipo kultūrų (ATCC CRI 1442), kepenų ląsteles SCF gamybai augino ant mikronešiklių 20-litrinėje perfuzinėje kultivavimo sistemoje. Šioje sistemoje buvo naudojamas Biolafit (modelis 1CC-20) fermentatorius, išskyrus tinklus, kurie buvo naudojami išlaikyti mikronešikliams ir vamzdeliai parūgštinimui. Tinklai, kurių porų diametras 75 μm buvo saugomi nuo užsikimšimo mikronešikliu periodiškai prapučiant, tai atliekama reguliuojamų vožtuvų ir siurblių sistemos pagalba, valdoma ESM. Kiekvienas tinklas funkcionuoja kaip mitybinė terpė ir kaip derliaus surinkimo vieta. Tokia osciliruojančios srovės savybė įgalina tinklo darbą be užsikimšimo. Parūgštinimo padavimas buvo vykdomas per silikonines žarnas (50 pėdų/15.4 m ilgio, vidinis diametras 0.25 d/6,3 mm, sienelės storis 0.03 d/0.76 mm). ERL 3A ląstelių kultivavimui naudojama auginimo terpė buvo sudaryta iš minimalios terpės (Erlzo, F.Gibko druskomis), 2 mmol glutamino, 3 g/l gliukozės, 2.95 g/l triptozės fosfato, 5% jaučio serumo ir 5% veršiuko serumo. Galutinė terpė buvo tokia pati, išskyrus serumus. Reaktoriuje buvo 2 Citodex (Pharmacia) mikronešikliai, kurių koncentracija 5 g/l, ir buvo

supilamas $3 \cdot 10^9$ ląstelių ERL 3A inokuliatas, išaugintas kratomuose buteliuose ir išskirtas tripsinizacija. Šioms ląstelėms leido prisijungti prie mikronešiklių ir 8 paras ant jų augti. Augimo terpę perfuzavo per reaktorių pagal gliukozės poreikį. Gliukozės koncentracija buvo palaikoma 1.5 g/l. Po 2 parų, reaktorių perfuzavo šešiais terpės, neturinčios serumo, tūriais, kad pasišalintų didžioji dalis serumo (baltymo koncentracija mažiau 50 mg/ml). Po to reaktorių dirbo integruotu režimu, kol gliukozės koncentracija nenukrito iki 2 g/l. Nuo šio momento reaktorių dirbo esant pastoviam perfuzijos greičiui, maždaug 10 l/per parą. pH buvo palaikomas 6.9 ± 0.3 , reguliuojant anglies dioksido padavimą. Ištirpusio deguonies koncentracija buvo palaikoma 20% aukštesnė, negu prisotinant oru, kadangi pagal poreikį buvo paduodamas grynas deguonis. Temperatūra buvo palaikoma $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Tokia nurodyta sistema generuoja maždaug 336 l kondicinės terpės, neturinčios serumo ir ją panaudoja kaip žaliavą gauti gamtiniam, gautam iš žinduolių ląstelių, žiurkės SCF faktoriui.

B. Valymas

Visos valymo operacijos atliekamos 4°C temperatūroje, jeigu kitaip nenurodyta.

1. Anijoninė chromatografija ant DEAE celiuliozės

Kondicinę terpę, generuotą auginant BRI 3A ląsteles ir neturinčią serumo, skaidrina filtracijos būdu per $0.45 \mu\text{m}$ Sartokapsules (firma Sartorius). Keletą įvairių partijų (41 l, 27 l, 39 l, 30.2 l, 37.5 l ir 161 l) atskirai koncentruojama, diafiltruojama/buferiniais mainais ir vykdoma jonų mainų chromatografija ant DEAE-celiuliozės vienodai visoms partijoms. Po to DEAE-celiuliozės partijas apjungia ir toliau papildomai apdoroja kaip vieną pavyzdį, kaip B2-5. Ilustracijai aprašytas 41 l apdorojimas. Nufiltruotą kondicinę terpę koncentruoja iki 700 l, naudojant tangentinės srovės ultrafiltracijos įrenginius (firma Millipor Pellicon) su 4 kasetėmis polisulfonine (molek.masė 10000) membrana. Bendras membranos plotas -20kv.pėdų (1.8 m^2), pratekėjimo greitis-1095 ml/min ir filtracijos greitis 250-315 ml/min. Po to vykdomi diafiltraciniai/buferiniai mainai anijonų mainų chromatografijos aparate, pridodant į koncentratą 500 ml buferio (50 mmol/l) Tris-HCl pH-7.8. Tirpalą pakartotinai koncentruoja iki 500 ml, naudojant ultrafiltracijos įrenginius su tangentine srove ir šią procedūrą pakartoja dar 6 kartus. Galutinai

koncentruotas/diafiltruotas preparatas gaunasi 700 ml tūrio. Šį preparatą paleidžia per anijonų mainų kolonėlę su DEAE-celiulioze (5x20.4 cm; derva DE-52, f.Batman), kurią privedė prie pusiausvyros 50 mmol/l Tris-HCl buferiu pH-7.8. Įvedus mėginį į kolonėlę praplaunama 2050 ml Tris-HCl buferiu ir įvedamas druskų gradientas (0-300 mmol/l natrio chlorido Tris-HCl buferyje, bendras tūris 4l). Frakcijos imamos po 15 ml esant tekėjimo greičiui 167 ml/val. Chromatograma parodyta Fig.1. Kolonų skaičius atitinka biologinį aktyvumą HPP-CCF bandyme. Tiriama nurodytų frakcijų 100 μ l. Šioje Fig.1 pieš. neparodytos frakcijos, paimtos įvedant mėginį į kolonėlę ir praplauta frakcija. Jos neturėjo biologinio aktyvumo.

Visų kondicinės terpės partijų po koncentravimo, diafiltracinių/buferinių mainų ir anijonų mainų chromatografijos charakteristikos buvo identiškos. Šių partijų baltymų koncentracija nustatyta pagal Bredfordo metodą (Apl.Bioch. 1976, 72 t., 248-254 psl.) su jaučio serumo baltymu, kaip standartu, ir sudarė nuo 30 iki 50 μ g/ml. Bendras kondicinės terpės, naudojamos šiam preparatui, tūris buvo apie 336 μ l.

2. Gel-filtracinė chromatografija ACA 54

Apjungiamos frakcijos, turinčios biologinį aktyvumą pagal naudotą metodą ant DEAE-celiuliozės kolonėlės. Kiekvienai iš šešių kondicinės terpės partijų, aptartų aukščiau (pvz., frakcija 87-1114, pavaizduota Fig.1.), ir koncentruoja iki suminio tūrio 74 ml, naudojant maišomas Amikon kiuvetes ir membranas UM 10. Ši medžiaga paduodama ant gel-filtracinės ACA 54(firma EKB) kolonėlės (Fig.2.) pristovos iki pusiausvyros Tris-HCl buferiu (50mmol/l), 50mmol/l natrio chloridu esant pH-7.4. Frakcijos imamos po 14 ml, esant tekėjimo greičiui 70 ml/val. Dėl to, kad inhibiciniai faktoriai eliuojasi kartu su aktyviomis frakcijomis, aktyvumo pikas (HPP-CSF kolonijų skaičius) pasidaro išskaidytas. Tačiau pagal ankstesnes chromatogramas, bedras eliatų aktyvumas koreliuoja su pagrindiniu baltymų piku ir todėl šios frakcijos apjungiamos.

3. Chromatografija ant agliutinino (iš daigintų kviečių)-agarozės.

Frakcijos 70-112 iš gel-filtracinės kolonos ACA 54 buvo apjungtos (500ml). Gautą mišinį padalijo perpus, naudojant agliutinino (iš daigintų kviečių)-agarozės kolonėlę

(5x24.5cm; derva iš E-U Laboratoris, San-Mateo, Kalifornija) (daigintų kviečių agliutinas turi atitinkamą angliavandenių struktūrą), primestą iki 20 mmol/l Tris-HCL buferio, 500 mmol/l natrio chlorido esant pH-7.4. Po mėginių įvedimo, kolonėlę praplauna maždaug 2200 ml kolonos buferiniu mišiniu, po to atliekamas surištosios medžiagos eliuavimas, paduodant N-acetil-D-gliukozamino 350mmol/l tirpalą, ištirpintą kolonos buferiniame tirpale, pradedant nuo 210 frakcijos (Fig.3.). Pila frakcijas po 13.25 ml esant tekėjimo greičiui 122 ml/val. Vieno chromatografijos bandymo rezultatai parodyti Fig.3. Frakcijų dalys, kurios buvo tiriamos, buvo dializuotos fiziologiniame tirpale su fosfatinu buferiu. Dializės medžiagos (5 μ l) tiriamos bandyme MC/(Fig.3 duotos CPM reikšmės impulsai/min) ir po 10 μ l HPP-SCF bandymui (Fig.3 parodyta kolonijų skaičius). Galima matyti, kad aktyvi medžiaga susiriša kolonoje ir eliuojasi N-acetil-D-gliukozaminu, tuo tarpu kai didžioji dalis priemaišų praeina per kolonėlę užnešant mėginius ir praplaunant.

4. Greitos srovės katijonų mainų chromatografija ant S-sefarozės

Frakcijos 211-225 iš agliutinino (iš daigintų kviečių)-agarozės chromatografijos, parodytos Fig.3 ir ekvivalenčios frakcijos iš antrojo bandymo buvo apjungtos (375ml) ir dializuotos 25 mmol/l natrio formiate pH 4.2. Siekiant sumažinti tokiu rūgščiu tirpalu veikimo laiką, dializė buvo atliekama 8 val. Šio dializės periodo pabaigoje mėginio tūris buvo 480 ml, kai pH reikšmė ir mėginio pralaidumas buvo artimi dializės buferiui. Dializės metu mėginyje atsiranda nuosėdos. Jas pašalina centrifuguojant 30 min. 22000x9.8 m²/sek. Po centrifugavimo supernatantą įveda ant greitos srovės kolonėlės su S-sefaroze (3.3x10.25cm, derva fimos Pharmacia), kuri privedama natrio-fosfato buferiu. Esant tekėjimo greičiui 465 ml/val, paima frakcijas po 14.2 ml. Po mėginio padavimo kolonėlę praplaunama 240 ml kolonos buferiniu tirpalu ir eliuoja surištą medžiagą gradientu 0-750 mmol/l natrio chloridu (natrio chloridas ištirpintas kolonos buferyje; bendras gradiento tūris 2200 ml), pradedant nuo 45 frakcijos, Eliuavimo profilis parodytas Fig.4. Į surinktas frakcijas įdeda 200 μ l Tris (0.97mol/l) privedus jo pH iki 7-7.4. Impulsų skaičius per min. (CPM) taip pat parodytas rezultatu, gautu biologiniame bandyme MC/9. Nurodytų frakcijų dalys dializuojamos fiziologiniame tirpale su fosfatinu buferiu ir 20 μ l mėginį atiduoda bandymams. Iš Fig.4 galima matyti,

kad didžioji dalis biologiškai aktyvios medžiagos praeina per koloną nesusirišusi. Priešingai, didesnė priemaišų dalis susiriša ir eliuojasi druskų gradientu.

5. Chromatografija panaudojant angliavandenių dervas, surištas su silikageliu

Frakcijos 4-40 iš kolonėlės su S-sefaroze (Fig.4) apjungia, gaudami 540 ml mišinio. 450 ml šio mišinio su tokiu pačiu buferio kiekiu (25% amonio acetato /100 mmol / l / + 75 % izopropilo alkoholio) leidžia srove 540 ml/val greičiu per C4 kolonėlę (Vidac Proteis C4; 2.4x2 cm), kuri privesta A buferiu (62.5% amonio acetato (60 mmol/l+37.5% izopropanolio). Įvedus mėginius, tekėjimo greitį sumažina iki 154 ml/val ir koloną praplauna 200 ml A buferio. Po to veikiama linijiniu gradientu nuo buferio A iki buferio B (bendras tūris 140 ml) ir surenka frakcijas po 9.1 ml. Mišinio porcijas, gautas po kolonėlės su S-sefaroze, kolonėlės C4 pavyzdys, praėjusį mišinį ir praplautą mišinį priveda iki jaučio serumo baltymų kiekio 40 µg/ml, pridėdant atitinkamus tūrius žaliavinio tirpalo 1 mg/ml ir produktas dializuojamas fiziologiniu tirpalu fosfatiniame buferyje. Analogiškai, gradiento frakcijų alikvotos po 40 µl apjungia su 360 µl fiziologinio tirpalo su fosfatinu buferiu, turinčiu 16 mg jaučio serumo baltymo ir šį mišinį dializuoja fiziologiniame tirpale su fosfatinu buferiu. Šios skirtingos frakcijos analizuojamos MC/9 bandyme (aliquotos po 6.3 µl paruoštų gradiento frakcijų; impulsų skaičius per min.-žr Fig.5). Bandymo rezultatai rodo, kad maždaug 75% aktyvios medžiagos yra praeinančioje ir praplovimo frakcijose, o 25% gradiento frakcijose, parodytose Fig.5. SDS-PAGE (Laemli Nature, 1970, 227 t., 680-685 psl.) koncentruojantys geliai turi 4% akrilamido, o skiriamieji geliai-12.5% akrilamido (skirtingų frakcijų alikvotos parodytos Fig.6). Demonstruojamų gelių alikvotų pavyzdžius džiovino vakuumu ir po to pakartotinai ištirpino, naudojant 20 µl pavyzdžio apdoroto buferio (neredukuojantis, t.y. be 2-merkaptoetanolio) ir virino 5 min. prieš užnešant į gelį. A ir B juostos atitinkamai atvaizduoja žaliavinę kolonos medžiagą (75 µl iš 890 ml) ir praėjusią frakciją (75 µl iš 880 ml).

Kairiojoje figūros dalyje sunumeruoti žymėjimai rodo migracinę padėtį markerių (sumažinti), turinčių molekulinį svorį 10^3 didesnį už nurodytus numerius. Šie markeriai yra fosforilazė (mol. sv. 97400), jaučio serumo baltymas (mol. sv. 66200), kiaušinio baltymas (mol. sv. 42700), anglies anhidrazė (mol. sv. 31000), sojos tripsino inhibitorius (mol.sv. 21500) ir lizocimas (mol. sv. 14400). 4-9 juostos atitinka frakcijas, paimtas po

gradiento (60 μ l iš 9.1ml). Gelis buvo nudažytas sidabru (Morisey, Anal. Bioch. 1981, 117 t., 307-310 psl.). Galima iš A ir B juostų palyginimo matyti, kad didžioji medžiagos dalis kuri gali nusidažyti, praeina per koloną. Nudažyta 4-6 frakcijų medžiaga truputį aukščiau ir žemiau esančiose dalyse mol sv. 31000- standartas-pagal biologinį aktyvumą sutampa su frakcijų gradientu (5 pieš.) ir yra biologiškai aktyvi medžiaga. Būtina pažymėti, kad ši medžiaga vizualiai matosi 4-6 juostose, bet ne A ar B todėl, kad daug didesnė dalis nuo bendro tūrio (0.66% nuo 4-6 frakcijų sumos, prieš 0.0084% nuo sumos A ir B) buvo užkrauta pirmu atveju. Iš šios kolonos 4-6 frakcijos buvo apjungtos.

Kaip buvo minėta anksčiau, maždaug 75% išaiškinto aktyvumo praeina per koloną C4 (Fig.5). Ši medžiaga buvo pakartotinai valyta chromatografiškai naudojant C4 dervą, praktiškai tokią, kaip aprašyta aukščiau, išskyrus tai, kad buvo naudojama daug didesnė kolona (1.4x7.8 cm) ir sumažintas srovės tekėjimo greitis (50-60 ml/val.) Maždaug 50% išaiškinto aktyvumo turėjo praeinanti frakcija ir 50% gradiento frakcija, kas yra analogiška SDS-PAGE aktyvioms gradiento frakcijoms bandyme, (Fig.6) Aktyvios frakcijos buvo apjungtos (29 ml).

Analitinė kolonėlė C4 praktiškai dirbo kaip ir aprašyta, gi frakcijos buvo ištirtos abiem biologiniais metodais. Kaip parodyta Fig.7, frakcijų, iš šios analitinės kolonos, biologiniai aktyvumai MC/9, o taip pat HPP-CSF eliuojasi analogiškai. Esant SDS-PAGE analizei (Fig.8) buvo išaiškintas baltymo, kurio molekulinis sv. 31000, kolonos frakcijoje buvimas, kuris ir sulaiko medžiagą, turinčią biologinį aktyvumą abiejuose bandymuose.

Aktyvi medžiaga, atitinkanti antrą (santykinai mažesni) aktyvumo piką, registruotą chromatografijoje ant S-sefarožės (pvz. Fig.4, 62-72 frakcijos, ankstyvosios frakcijos druskų gradientu) taip pat buvo išvalyta C4 chromatografijos metodu. Ji pademonstravo tokias pačias charakteristikas ant SDS-PAGE ir turėjo tokią pačią N-galo amino rūgščių seką (žr. 2D pvz.), kaip ir medžiaga, gauta C4 chromatografijoje iš praeinančių frakcijų ant S-sefarožės.

6. Valymo reziumė

Aprašytos aukščiau 1-5 apibendrintos valymo stadijos pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė

Žinduolių CSF faktoriaus valymo apibendrinti duomenys

Stadija	Tūris, ml	Baltymo kiekis,
---------	-----------	-----------------

		mg ⁵
Kondicinė terpė	335700	13475
DEAE celiuliozė ¹	2900	2164
ACA-54		1513
Agliutininas (iš kviečių daigų)-agarozė ²	375	431
S-sefarozė	540 ⁴	10
Derva C4 ³	57.3	0.25-0.40 ⁶

¹Pateiktos reikšmės rodo dydžių sumą skirtingoms partijoms, aprašytoms tekste.

²Kaip aprašyta aukščiau pavyzdyje, aptarta medžiaga, kuri pasirodo preparate, skirtame chromatografijai ant S-sefarozės šio pavyzdžio dializės eigoje, buvo pašalinta centrifuguojant. Po centrifugavimo pavyzdys turėjo maždaug 264mg baltymo.

³Aktyvių gradiento frakcijų iš dviejų bandymų ant C4 kolonos suderinimas paeiliui, kaip ir aprašyta.

⁴Sekančioje stadijoje (šis pvz. aukščiau) buvo naudota tik 450 ml šios medžiagos.

⁵Nustatyta Bredfordo metodu (žr. aukščiau, 1976), išskyrus aptartus atvejus.

⁶Įvertinimas, remiantis intensyvumu nudažius sidabru po SDS-PAGE, ir po aminorūgščių sudėties analizės, kaip aprašyta 2 pavyzdžio skyriuje.

D. SDS-PAGE glikozidazinis apdorojimas

Apjungtų gradiento frakcijų po dviejų praleidimų ant C4 didelių išmatavimų kolonos, SDS-PAGE duomenys pateikti Fig.9. Į pirmą C4 kolonėlę pakrovė 60 µl mišinio (1 juostelė) ir į antrą C4 kolonėlę 40 µl mišinio (2 juostelė). Šios gelio juostelės buvo nudažytos sidabru. Molekulinio svorio markeriai buvo tokie patys, kaip aprašyta Fig.6. Kaip buvo paminėta, difuziškai migruojanti medžiaga, kurios molekulinis svoris aukštesnis ir žemesnis lyginant su markeriu 31000, yra biologiškai aktyvi medžiaga. Didelio laipsnio heterogeniškumą apsprendžia glikozilinimo heterogeniškumas.

Norint charakterizuoti glikozilinimą, išvalyta medžiaga paveikiama jodo izotopu J-125, apdorojama daugybe glikozidazių ir analizuojama SDS-PAGE metodu (atstatytomis sąlygomis) autoradiografijos pagalba. Rezultatai parodyti Fig.9. 3 ir 9 juostelės yra žymėta jodo izotopu medžiaga be jokio glikozidazinio apdorojimo. 4 ir 8 juostelės atitinka izotopu žymėtą medžiagą, apdorotą glikozidazėmis, kaip aprašyta

žemiau: 4 juostelė-neuraminidaze, 5-neuraminidaze ir O-glikanaze, 6-N-glikanaze, 7-neuraminidaze ir N-glikanaze. Apdorojimo sąlygos: 5 mmol/l 3-((3-cholamidopropil)dimetilamonio)-1-propansulfonato (CHAPS), 33 mmol/l 2-merkaptoetanolio, 10mmol/l Tris-HCl buferio, pH 7-7.2, 3 valandas, esant 37°C temp. Neuraminidazė (iš *Arthrobacter ureafaciens* organizmo, firma Calbiochem) buvo naudojama galutine koncentracija 0.23 U/ml. O-glikanazė (Genzim; endo-alfa-N-acetilgalaktozaminazė) buvo naudojama 45 mU/ml koncentracijos; N-glikanazė (Genzim; peptidas: N-glikozidazė F; peptidas-N⁴ (N-acetil-beta-gliukozaminil asparaginamidazė) naudojama 10 U/ml koncentracijos.

Gauti rezultatai buvo analogiški tiems, kurie pateikti Fig.9, apdorojant žymėtą išvalytą SCF glikozidazėmis ir vizualiam įvertinimui po SDS-PAGE dažant sidabru.

Esant būtinumui, buvo atliekami įvairūs kontroliniai kultivavimai. Juos sudarė: kultivavimas atitinkamame buferyje, be glikozidazės siekiant patvirtinti, kad rezultatus įtakojo glikozidazių preparatų pridėjimas. Kultivavimas su glikoziduotais baltymais (pvz., glikozilintu rekombinantiniu žmogaus eritropoetinu) kaip žinoma, yra substratai glikozidazėms, norint patvirtinti, kad naudoti glikozidaziniai fermentai buvo aktyvūs; ir kultivavimas su glikozidazėmis, tačiau ne su substratais, siekiant patvirtinti, kad pačios vienos glikozidazės neįtakoja ar netrukdo vizualiniam gelio juostelių įvertinimui.

Be kita ko, glikozidazinis apdorojimas buvo vykdomas su endo-beta-()-acetilgliukozamidaze F (endo F; (E)(Diupon) ir su endo-beta-()-acetilgliukozaminidaze H (endo H; firma (E)(Diupon) ir šiose kultivavimo operacijose esant atitinkamai kontrolei. Endo apdorojimo sąlygos buvo tokios: 3 min. virinama esant 1 masės % SDS, 100 mmol/l 2-merkaptoetanolui, 100 mmol/l etilendiamintetra-acto rūgščiai, 320 mmol/l natrio fosfatui, pH 6; po to seka 3-kartinis praskiedimas įvedant Nonidet Pi-40 (1.17 tūrio% galutinė koncentracija), natrio fosfato (200 mmol/l galutinė konc.) ir endo F (7 U/ml galutinė koncentracija). Endo H apdorojimo sąlygos buvo analogiškos, išskyrus tai, kad SDS koncentracija buvo 0.5% (masė/tūris) ir endo H buvo naudojama 1μg/ml koncentracijos. Rezultatai su endo F buvo tokie patys kaip ir su N-glikanaze, tuo tarpu kai endo H neveikė išvalytos SCF medžiagos.

Iš aukščiau aprašytų glikozidazės eksperimentų galima padaryti eilę išvadų. Įvairūs apdorojimai N-glikanaze (kuri pašalinama kaip kompleksinis, taip ir N-surišantis

angliavandeniu su dideliu manozės kiekiu (Tarentino ir kt. Biochem, 1985, 24 t., 4665-4671 psl.) endo F, kuri veikia analogiškai N-glikanazei (Elder ir Alexander, Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 1982, 79 t., 4540-4544 psl.), endo H, kuri pašalina didelius manozinius ir kai kuriuos N-surišančius hibridinio tipo angliavandenius (Tarentino ir kt. Meth.Enzym. 1978, 50C t., 574-580 psl.), neurominadaze, kuri pašalina sialinės rūgšties likučius, ir O-glikanaze, kuri pašalina kai kuriuos O-surištus angliavandenius (Lambin ir kt. Bioch. Soc.Trans, 1984, 12 t., 599-600 psl.), įgalina manyti sekančias. Egzistuoja kaip N-, taip ir O-surišti angliavandeniai; didesnė N-surištų angliavandenių dalis priklauso kompleksiniam tipui; egzistuoja sialinė rūgštis, be kita ko nemažesnė jos dalis įeina į O-surišančias funkcines grupes. Iš duomenų apie amino rūgščių seką (2 pvz.) gali būti gaunama kokia nors informacija apie N- surišimo centrus. Tas faktas, kad apdorojant N-glikanaze endo F ir N-glikanaze/neuraminidaze heterogeninę medžiagą, matomai, SDS-PAGE pagalba, gali paversti į greičiau migruojančias formas kurios daug homogeniškesnės, atitinka tas išvadas, kad visa ši medžiaga yra vienas ir tas pats polipeptidas, kurio heterogeniškumas iššauktas heterogeniškumo glikozilinimo metu. Taip pat pažymėtina, kad mažos formos, gautos kombinacijų, apdorojant skirtingomis glikozidazėmis metu, turi molekulinį svorį nuo 18 iki 20 tūkst., markerių, naudojamų SDS-PAGE, molekulinio svorio atžvilgiu.

Patvirtinimui to, kad difuziškai-migruojanti medžiaga artima sričiai, kur molek. sv. yra 31 tūkst., esant SDS-PAGE, yra biologiškai aktyvi medžiaga, turinti tą pačią pagrindinę polipeptidinę grandinę, yra tas faktas, kad amino rūgščių sekos duomenys, gauti iš medžiagos, migruojančios šioje srityje (pvz., po elektroforezės ir apdorojimo bromianu, 2 pvz.), atitinka, kas pademonstruota išskirtam genui, kurio ekspresija rekombinantinės DNR priemonėmis priveda prie biologiškai aktyvios medžiagos (4 pvz.).

2 pavyzdys. Žinduolių SCF faktoriaus amino rūgščių sekos analizė

A. Išvalyto baltymo atvirkščių fazių aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (HPLC)

Maždaug 5 µg SCF faktoriaus, išvalyto kaip parodyta pvz. 1 (koncentracija 0.117 mg/ml) leidžiama atvirkščios fazės HPLC sistemoje, naudojant C4 žemo poringumo

koloną (Widak, porų plotis 30 mm, kolonos dydis 2x15 cm). Baltymas eliuojasi linijiniame gradiente nuo 97% mobilios fazės A (0.1% trifluracto rūgšties)/3% mobilios fazės B (90% acetonitrilo 0.1% triftoacto rūgštyje) iki 30% judančios fazės A/70% judančios fazės B 70 min., su sekančiu trumpalaikiu eliuavimu dar 10 min., esant srovės tekėjimo greičiui 0.2 ml/min. Baigus chromatografiją tuščiu buferiniu tirpalu 5C, išryškėja vienintelis simetriškas pikas, esant sulaikymo laikui 70.05 min., kaip parodyta Fig.10. Šiomis sąlygomis negalima buvo stebėti kokių nors pikų, kuriuos duotų pagrindiniai teršiantys baltymai.

B. Baltymo juostų sekos tyrimas po elektroforezės

SCF faktorius, išvalytas kaip 1 pavyzdyje (0.5-1.0 nanomolių) apdorojamas tokiu būdu: (-)-glikanaze, fermentu, kuris specifiškai atiša asparagino-surištas angliavandenių funkcines grupes, kurios kovalentiškai pririštos prie baltymų (žr., 1D pvz.). 6 ml sumaišytos medžiagos iš 4-6 kolonos C4 (Fig.5) frakcijos išdžiovino vakuume. po to pripylė 150 µl CHAP5 tirpalo (14.25 mmol/l), 100 mmol/l 2-merkaptoetanolio, 335 mmol/l natrio fosfato pH -8.6 ir kultivavo 95 min. 37°C temperatūroje. Pridėjo dar 300 µl 74 mmol/l natrio fosfato tirpalo, 15 U/ml //-glikanazės pH-8.6 ir dar kultivavo 19 val. Po to pavyzdį užnešė į 9-18% SDS-poliakrilamidinį gradientinį gelį (0.7 mm storio. 20x20 cm). Baltymines juostas gelyje elektroforetiškai pernešė ant polivinildifluorido (PVDF, firma Millipor Corp.), naudojant 10 mmol/l Kapso buferį (pH 10.5), esant pastoviai 0.5A srovei 1 val. (Macudaira, J.Biol., Chem. 1987, 261 t., 10035-10038 psl.). Vizualizavimui perneštos baltymų juostos buvo nudažytos Coomasi Blue. Buvo aptiktos juostos, kurių molekul. sv. 29-33 tūkst. ir 26 tūkst., t.y. deglikozilinimas praėjo tikrai dalinai (lyginti su 1D pvz., Fig.9.). Pirma juosta atitinka nesuardytą medžiagą, o paskutinė-medžiagą, iš kurios pašalintas N-surišantis angliavandenis. Gelio dalis išpjauna ir patalpina (40%-molekul. sv. 29-33 tūkst. ir 80%-baltymui su molekul. sv. 26000) į baltymų sekų analizatorių (Appl Biosystem Inc., modelis 477). Baltyminių sekų analizę atlieka naudojant programas, kurias pateikia gamintojas (Hevik ir kt., J.Biol.Chem. 1981, 256 t., 7990-7997 psl.), o išsiskyrusias feniltiohidantoinines aminorūgštis analizuoja srovėje, naudodami atvirkščių fazių aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją su C18 mikroporomis. Abi pusės nerodė signalų

20-23 sekų ciklams, dėl ko manoma, kad abi šios medžiagos nepraeina sekų analizės, naudojant metodologiją su Edmano chemija. Tokio sekų eilės išaiškinimo bandyme fono lygis yra 1-7 pikomoliai, kas yra daug žemiau už tokį baltymų kiekį, koks yra juostose. Pagal šiuos duomenis galima teigti, kad baltymas juostose blokuojamas N-gale.

C. Elektroforetiškai pernešto baltymo skaldymas ciano bromidu *in situ* ir sekos analizė

Norint patvirtinti tai, kad baltymas iš tikrųjų buvo blokuotas, iš sekų analizatoriaus (B dalis) pašalino membrana ir *in situ* dėmėtas juostas suskaldė ciano bromidu CNBr (5% tirpalas 70%-tinėje skruzdžių rūgštyje) 45°C temperatūroje, 1 val. Po to išdžiovino ir analizavo sekas. Buvo fiksuoti stiprūs sekų signalai, atitinkantys vidinius peptidus, gautus suskaldžius metionilo-peptidinį ryšį ciano bromidu. Abi juostos davė identiškus sumaišytos sekos signalus, išvardintos žemiau pirmiems penkiems ciklams.

Ciklai	Identifikuotos aminorūgštys
1	Asp, Glu, Val, Ile, Leu
2	Asp, Tre, Glu, Ala, Pro, Val
3	Asn, Ser, His, Pro, Leu
4	Asp, Asn, Ala, Pro, Leu
5	Ser, Tyr, Pro

Be to, abi juostos davė vienodus signalus per visus 20 ciklų. Pradinės išeigos buvo 40-115 pikomoliai juostai, kurios molekul. sv. 26000 ir 40-150 pikomoliai 29-33 tūkst. juostai. Šios reikšmės buvo sulygintos su baltymo, pakrauto į sekų analizatorių, išeiginiais dydžiais. Šie rezultatai patvirtina tai, kad baltymų juostos, atitinkančios SCF faktorių, turėjo blokuotą N-galą. Metodikos, naudotos naudingos informacijos apie N-galo blokuojamų baltymų sekas, gavimui, yra: a) N-galo deblokavimas (žr. D skyrių) ir b) peptidų generavimas vidinio skaldymo ciano bromidu būdu (žr. E skyrių), tripsinu (žr. F skyrių) ir proteaze (Glu-Si) iš *Staphylococcus aureus* (U-8 kamienas) (žr. C skyrių). Sekos analizę galima vykdyti po amino rūgščių, blokuotų N-gale, pašalinimo ar po peptidinių fragmentų išskyrimo. Žemiau smulkiai aprašyti pavyzdžiai.

D. Kamieninių ląstelių faktoriaus BRL, apdoroto piroglutaminės rūgšties aminopeptidaze, sekų analizė

Buvo sunku nuspėti blokuojančios funkcijos, esančios prie SCF galinės aminogrupės, cheminę prigimtį. Šis blokavimas gali būti potransliacinis gyvam organizme (F.World, Ap.Rev.Bioch. 1981, 50t., 783-814 psl.) arba gali vykti valymo metu ne organizme. Dažniausiai buvo stebimos dvi potransliacinės modifikacijos. Gali vykti atitinkamų N-galo aminorūgščių, tokių kaip Ala, Ser ir kt., acetilinimas, kurį ir katalizuoja N-alfa-acetil-transferazė. Tai galima patvirtinti izoliacija ir N-galo blokuoto peptido masės-spektrofotometrine analize. Jeigu baltymo galinė aminogrupė yra glutaminas, tai gali vykti jo gama-amido deamidinimas. Po to gali vykti ciklizacija, įjungianti gama-karboksilatą ir laisvą N-terminalą susidarant piroglutamalui. Norint aptikti glutamatą, gali būti naudojamas fermentas piroglutamato aminopeptidazė. Šis fermentas pašalina piroglutamato likutį, palikdamas laisvą galinę aminogrupę. Sekų analizei po to galima naudoti Edmano chemiją.

SCF (išvalytą kaip I pvz., 400 pikomolių) kultivuoja 50 mmol/l natrio fosfatiniame buferyje (pH 7.6, kuriame yra ditiotreitolas ir etilendiamintetraacto rūgštis) su 1.5 vienetais piroglutamino rūgšties iš veršiuko kepenų (pE-AP) amidopeptidazės 37°C temperatūroje 16 val. Po to reakcijos mišinį patalpina į baltymų sekų analizatorių. Pagrindinė seka gali būti identifikuota per 46 ciklus. Pradinė išeiga buvo maždaug 40%, o galutinė - 94.2%. SCF N-galo sekos, įskaitant piroglutamino rūgštį, buvo:

pE-AP suskaldymo vieta	10
20	
piroGlu-Glu-Ile-Cys-Arg-Asn-Pro-Val-Tre-Asp-Asn-Val-Lys-Asn-Ile-Tre-Lys-Leu-Val-Ala-	
30	
40	
Asn-Leu-Pro-Asn-Asp-Tyr-Met-Ile-Tre-Leu-Asn-Tyr-Val-Ala-Gly-Met-Asp-Val-Leu-Pro-Ser-	

His-xxx-Trp-Leu-Arg-Asp-.....xxx, 43 padėtyje neiššifruota. Šie rezultatai rodo, kad SCF turi piroglutamino rūgštį kaip N-galinę grupę.

E. Bromcian-peptidų išskyrimas ir analizė.

SCF faktorius, išvalytas kaip parodyta 1 pavyzdyje, (20-28 µg; 1.0-1.5 nanomolių) apdorojamas N-glikanaze, kaip aprašyta 1 pvz. Šiuo atveju fiksuojamas pilnas pavertimas į medžiagą, kurios molekul. sv. 26000. Šį pavyzdį džiovino ir suskaldė ciano bromidu 70% skruzdžių rūgštyje (5% bromciano) 18 val. kambario temperatūroje. Suskaldytą produktą skiedė vandeniu, džiovino ir pakartotinai ištirpino 0.1% trifluoracto rūgštyje. Bromciano peptidai buvo išskirti atvirkščių fazių skysčių aukšto efektyvumo chromatografijos metodu, naudojant žemo poringumo C4 koloną ir eliuavimo sąlygas identiškas aprašytoms šio pavyzdžio A skyriuje. Buvo išskirta keletas pagrindinių peptidų frakcijų ir išanalizuota jų seka. Rezultatai pateikiami lentelėje:

Peptidas	Išlaikymo trukmė	Seka
T-1	7.1	E-S-L-K-K-P-E-T-R
T-2 ¹	28.1	V-S-V-()-K
T-3	32.4	I-V-D-D-L-V-A-A-M-E-E-N-A-P-K
T-4 ²	40.0	N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-()-R
T-5 ³	46.4	a. L-V-A-N-L-P-N-D-Y-M-I-T-L-N-Y-V-A-G-M-D-V-L-P-S-H-C-W-L-R b. S-I-D-A-F-K-D-F-M-V-A-S-D-T-S-D-C-V-L-S-()-()-L-G----
T-7 ⁴	72.8	E-S-L-K-K-P-E-T-R-(N)-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-()-R
T-8	73.6	E-S-L-K-K-P-E-T-R-N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-D-R

¹Padėtyse 12,13 ir 25 aminorūgštys nenustatytos. Peptidas b nebuvo išanalizuotas iki galo.

²(N) CB-15 nebuvo aptiktas; buvo padaryta prielaida, kad jis yra potencialiame glikozilinio N-surišimo centre. Peptidas nebuvo išanalizuotas iki galo.

³Reiškia centrą, kur Asn gali būti paverstas į Asp, pašalinant N-surišantį cukrų N-glikanaze.

⁴Buvo naudotas vieningas raidžių kodas: A-Ala, C-Cys, D-Asp, E-Glu, F-fen, G-Gly, H-His, I-Ile, K-Lys, L-Leu, M-Met, N-Asn, P-Pro, O-Gln, R-Arg, S-Ser, T-Thre, V-Val, W-Trp ir U-Tyr.

BRL kamieninių ląstelių faktoriaus triptinių fragmentų išskyrimas ir analizė.

Išvalytas SCF, kaip 1 pvz. (20 µg) 160 µl bikarbonatiniame moliariniame tirpale buvo degeneruotas su 1 µg tripsino 37°C temperatūroje. 3.5 val. Degeneravimo produktas buvo iš karto perneštas į koloną su atvirkščia faze C4 (žemo poringumo). Aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją vykdė identiškomis eliuavimo sąlygomis, kaip aprašyta šio pavyzdžio A skyriuje. Visi eliotų peptidų pikai turėjo sulaikymo periodus besiskiriančius nuo tų, kurie buvo pastebėti nedegeneruoto SCF atveju (A skyrius). Išskirtų peptidų sekų analizė pateikiama:

Peptidas	Sulaikymo trukmė	Seka
CB-4	15.5	L-P-P---
SB-6 ¹	22.1	a. I-T-L-N-Y-V-A-G-(M) b. V-A-S-D-T-S-D-C-V-L-S-()-()-L-G-P-E-K-D-S-R-V-S-V-()-K----
SB-8	28.0	D-V-L-P-S-H-C-W-L-R-D-(M)
CB-10	30.1	(CB-8 seka)
CB-15 ²	43.0	E-E-N-A-P-K-N-V-K-E-S-L-K-K-P-T-R-(N)-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-D ³ -R-S-I-D-A-----
CB-14 IR CB-16	37.3	abu peptidai turi identišką seką CB-15

¹4 padėtyje aminorūgštis neiššifruota.

²12 padėtyje aminorūgštis neiššifruota.

³T-5 šeštame peptide 20 ir 21 padėtyse aminorūgštys neiššifruotos: joms buvo priskirta cukraus O-surišimo centrų struktūra.

⁴10 padėtyje aminorūgštis nebuvo aptikta; padaryta išvada, kad ji yra Asn glikozilavimo potencialaus N-surišimo centre.

21 padėtyje aminorūgštis nebuvo aptikta.

BRL-SCF peptidų sekų, po Saurens Glu-C proteazinio skaldymo, išskyrimas ir nustatymas

SCF valė pagal 1 pavyzdį (20 mg/150ml 0.1 M amonio bikarbonato tirpale) ir veikė Glu-C proteaziniu skaldymu, santykiu proteazė-substratas 1:20. Procesas vyko 18 val. 37°C temperatūroje. Produktas tirtas aukšto efektyvumo atvirkščių fazių siaurakanaline skysčių chromatografija. Buvo surinktos 5 pagrindinės frakcijos ir paskirstytos taip:

Peptidas	Sulaikymo trukmė	Seka
S-1	5.1	N-A-P-K-N-V-K-E
S-2	27.7	S-R-V-S-V-(N)-K-P-F-M-L-P-P-U-A-(A)
S-3	46.3	seka nenustatyta
S-5	71.0	S-L-K-K-P-E-T--N-F-T-P-E-E-F-F-S-I-F-(N)-R-S-I-D-A-F-K-D-F-M-U-A-S-D
S-6	72.6	S-L-K-K-P-E-T-R-N-F--T-P-E-E-F-F-S-I-F-(N)-R-S-I-D--A-F-K-D-F--M-U-A-S-D-T-S-D

¹Peptido S-2 aminorūgštis 6 pozicijoje nebuvo nustatyta: tai galėjo būti padėtis, kurioje prisijungia O- surištas cukrus. Peptido S-2 Ala 16 pozicijoje rasta maža išeiga.

²S-3 peptidu gali būti N-galo blokuotas peptidas, SCF N- liekanos darinys.

³(N) buvo priskirta potenciali vieta N-surišto cukraus prijungimui.

H. SCF sekos analizė po BNPS-skaldymo.

SCF (2mg) 10 ml amonio bikarbonato išdžiovino iki pastovaus svorio vakuuminiu centrifugavimu ir po to dar kartą ištirpino 100 ml ledinėje acto rūgštyje. Į tirpalą įpylė 10-20-kartinį moliarinį BNPS-skatolo perteklių ir mišinį termostatavo 50°C 60 min. Reakcijos mišinys po to buvo išdžiovintas vakuuminiu centrifugavimu. Išdžiovintas likutis po to buvo ekstrahuotas 100 ml vandens ir dar kartą 50 ml vandens. Apjungtus ekstraktus po to analizavo, kaip aprašyta aukščiau. Buvo stebima tokia seka:

10

20

Leu-Arg-Asp-Met-Val-Thr-His-Leu-Ser-Val-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Asp-Lys-Phe-Ser-

Asn-

30

40

Ile-Ser-Glu-Gly- Leu-Ser-(Asn)-Tyr-Ser-Ile-Ile-Asp-Lys-Leu-Gly-Lys-Ile-Val-Asp----

Padėtis 28 nebuvo tiksliai nustatyta: ji buvo nustatyta kaip Asn, esanti potencialaus glikozilinio N-surišimo vietoje.

I. BRL SCF C-galo aminorūgščių nustatymas.

SCF-baltymo (500 pikomolių) alikvota buvo patalpinta į 10 mM natrio acetato buferį, pH 4.0 (galutinis tūris 90 ml) ir pridėta Brij-35 iki 0.05% (masė/tūriui). Kiekybiniam baltymo nustatymui ėmė 5 ml alikvotą. 40 ml pavyzdžio praskiedė iki 100 ml aukščiau minėtu buferiu, po to pridėjo karboksipeptidazės P (iš *Penicillium janthinellum*) santykiu fermentas-substratas 1:200. Procesą vykdė 25°C; 20 ml alikvotas ėmė po 0, 15, 30, 60 ir 120 min. Procesą nutraukdavo kiekvieną kartą nurodytu laiku pridėdami trifluoracto rūgšties iki galutinės koncentracijos 5%. Pavyzdžiai buvo išdžiovinami ir aminorūgščių išsiskyrimas buvo nustatomas reakcija su dabsilchloridu (dimetil-aminobenzensulfonilchloridu) 0.2 mM NaHCO₃ (pH 9.0) 70°C temperatūroje 12 min. (Chang ir kt. Meth.Enzym. 90, 41-48, 1983). Susidariusios aminorūgštys (16 kiekvieno pavyzdžio) buvo analizuojamos siaurakanaliu atvirkščių fazių HPLC metodu, modifikuotu Chang ir kt. (Techn. in Protein Chem, T.Hugli, ed. Ac.Press, NY (1989), 305-311 pp). Kiekvieną nurodytą momentą kiekybiniai rezultatai buvo gauti palyginant su standartinėmis žinomomis aminorūgštimis (1 pikomolis). Pradžioje buvo stebimas suardytas glicinas. Inkubacijos metu vienintelė aminorūgštis, kurios išaugo kiekis, buvo alaninas. Po 2 inkubacijos val., buvo nustatytas bendras kiekis Ala 25 pikomoliai: ekvivalentiškas 0.66 moliui Ala, išlaisvintas iš molio baltymo. Šis rezultatas rodo, kad gamtinė SCF molekulė žinduolių organizme turi Ala karboksilinės liekanos pavidalę, kas atitinka C-galo S-2 peptido sekos analizę, kuri turi C-galo Ala. Ši išvada taip pat sutinka su žinomu karboksipeptidazės specifiškumu, PtLu ir kt., J.Chromat. 447, 351-364 (1981). Pvz., skaldymas nutraukiamas, jeigu sutinkama seka Pro-Val. S-2 peptidas turi seką S-R-V-S-V-(T)-K-P-F-M-L-P-P-V-A-(A) ir apspręstas C-galo peptidu SCF (žr. šio pavyzdžio skyrių).

C-galo seka ---P-V-A-(A) riboja proteazinį skaldymą tikrai iki Ala. Peptido S-2 aminorūgščių sudėtis parodo atliekamas 1 Thr, 2 Ser, 3 Pro, 2 Ala, 3Val, 1 Met, 1Leu, 1 Phe, 1 Lys, 1Arg, viso 16 liekanų. Nustatytos 2 Ala liekanos rodo, kad gali būti 2 Ala

liekanos šio peptido C-gale (žr. lentelę skyriuje G). Tokiu būdu BRL SCF baigiasi Ala 185.

1. SCF sekos

Apjungus rezultatus, gautus po nepažeisto SCF, po jo N-galo pirogliutamino rūgšties, (2) CNBr-peptidų, (3) tripsino peptidų, (4) 4 Glu ir C-peptidazės fragmentų pašalinimo sekos analizės, buvo nustatytos N- ir C-galo sekos (11 pieš.) N-galo seka prasideda pirogliutaminine rūgštimi ir baigiasi Met⁴⁸. C-galo seka turi 84/85 aminorūgštis (padėtys nuo 82 iki 164/165). Seka nuo 49 iki 81 padėčių nebuvo pastebėta nei viename išskirtame peptide. Tuo labiau didelio, po BNPS-skatolinio skaldymo, peptido nustatyta seka buvo kaip aprašyta šio pavyzdžio H skyriuje. Iš šių papildomų duomenų, o taip pat iš DNR sekos, gautos iš žiurkės SCF (3 pvz.), C- ir N-galo sekos gali būti suprastos ir gali būti nustatyta bendra seka, kaip parodyta Fig.11. Molekulės N-gale yra pirogliutamino rūgštis; C-gal-Ala, ką patvirtina pirogliutamaminopeptidazinis ir atitinkamai karboksipeptidazinis procesas.

Iš sekų duomenų išplaukia, kad Asn-72 glikozilinta; Asn-109 ir Asn 120, matomai, glikozilintos kai kuriose molekulėse. Asn-65 gali būti pastebėta analizuojant sekas ir, tuo pačiu, gali būti tik iš dalies glikozilinta, jeigu iš viso gali. Ser-142, Thr-143, Thr-155, spėjami iš DNR sekos, negalėjo būti nustatyti aminorūgščių analizės metu, ir to pasekoje galėjo būti O-surišto angliavandenio prijungimo vietoje. Šios galimos angliavandenio prijungimo vietos nurodytos Fig.11. N-surištas angliavandenis išskirtas storu šriftu; O-surištas angliavandenis nurodytas paprastu šriftu.

K. BRL SCF aminorūgščių kompozicinė analizė

Aminorūgščių kompozicinei analizei buvo paruošta medžiaga iš C4 kolonos, Fig.7, gauta koncentravimo ir buferinių mainų 50 mM amonio bikarbonate, būdu. Du pavyzdžiai po 70ml buvo atskirai hidrolizuoti 6 N HCl, turinčioje 0.1% fenolio ir 0.05% 2-merkaptoetanolio 110°C 24 val. vakuume. Hidrolizatus išdžiovino, patalpino į natrio citrato buferį ir analizavo, naudodant jonų mainų chromatografiją (aminorūgščių analizatorius Beckman Model 6300).

Rezultatai pateikti 3 lentelėje. 164 aminorūgščių panaudojimas (iš baltyminių sekų duomenų) siekiant nustatyti aminorūgščių sudėtį, labiau atitinka spėjamosioms reikšmėms, negu 193 aminorūgščių naudojimas (kaip nustatyta iš PCR-DNR-darinių sekos duomenų. (Fig.14C).

3 lentelė

Žinduolių SCF kiekybinė aminorūgščių sudėtis

Aminorūgščių sekos			Spėjamos	
Moliai moliui baltymo		liekanos molekulei		
Aminorūgštis	1 bandymas	2 bandymas	(A)	(B)
Asn	24.45	24.28	25	28
Thr	10.37	10.43	11	12
Ser	14.52	14.30	16	24
Glu	11.44	11.37	10	10
Pro	10.90	10.85	9	10
Gly	5.81	6.20	4	5
Ala	8.62	8.35	7/8	8
Cys	nerasta	nerasta	4	4
Val	14.03	13.96	15	15
Met	4.05	3.99	6	7
Ile	8.31	8.33	9	10
Leu	17.02	16.97	16	19
Tyr	2.86	2.84	3	7
Phe	7.96	7.92	8	8
His	2.11	2.11	2	3
Lys	10.35	11.28	12	14
Trp	nerasta	nerasta	1	1
Arg	4.93	4.99	5	6
Viso:	158	158	164/165	193

Paskaičiuotas molekulinis svoris-18424.

¹Remiamasi baltyminės sekų analizės 158 liekanomis (išskyrus Cys ir Trp).

²Teoriniai dydžiai paskaičiuoti iš baltymo sekos duomenų (A) ir DNR sekos (B) duomenų.

³Remtasi 1-64 seka.

Žinomo vidutinio kiekio standarto įvedimas į aminorūgščių kompozicijos analizę taip pat įgalina kiekybiškai nustatyti baltymą pavyzdyje: Analizuojamo pavyzdžio dydis buvo gautas 0.117 mg/ml.

3 pavyzdys

Žiurkių ir žmogaus SCF genų klonavimas

A. Žiurkių SCF kDNR fragmentų amplifikacija ir sugrupavimas

Žiurkių SCF baltymo fragmentų aminorūgščių sekų nustatymas leido sudaryti sujungtą, specifinę žiurkės SCF oligonukleotidų seką. Oligonukleotidai imami kaip hibridizacijos testas žiurkės kDNR genomo duotų bazių atskyrimui ir kaip pradmuo bandyme aplifikuojant kDNR dalis, naudojant polimerazės ciklinės reakcijos (PCR) strategiją (Mullis ir kt. Meth. in Enzym. 155, 335-350 (1987). Oligonukleotidus sintetino pagal fosfatinį metodą (Beansage et al, Tetrahedron Lett, 22, 1859-1862, 1981); (Mc Bride et al, Tetrahedron Lett, 24, 245-248, 19983); jų sekos parodytos Fig.12A. Raidėmis pažymėta A-adeninas; T-timinas; C-citozinas; G-guaninas; I-inozinas. Fig.12A ženklų “*” pažymėti oligonukleotidai, kurie turi apribojimų atpažįstant endonukleazines sekas, sekos parašytos 5'→3'.

Naudojant sumaišytų oligonukleotidų su žymėtu 32-fosforu tyrimus, buvo atrinktas žiurkių genominio kepenų kDNR ir du BRL kDNR bankų duomenys 219-21 ir 219-22 (Fig.12A), kurių sekos remiasi aminorūgščių sekomis, gautomis pagal 2 pavyzdį. Šiuose eksperimentuose su standartinio metodo kDNR-klonavimu nebuvo išskirti klonai SCF (Maniatis et al, Molec.Cloning, Cold Spring Harbor, 212-246, 1982).

Alternatyvus priartėjimas ir rezultate išskirtos SCF nukleino rūgščių sekos, apėmė PCR technikos naudojimą. Pagal šią metodologiją DNR sritis, apsupta dviem pirminėmis DNR, naudojant daugkartinius replikacijos ciklus, katalizuojamus priimtina DNR-polimeraze (tokia kaip Tag DNR polimerazė), esant trifosfato dezoksinukleozidui, selektyviai amplifikuojasi *in vitro* termocirkuliacijoje. PCR-amplifikacijos specifiškumas bazuojasi ant dviejų pirminių oligonukleotidų, flankiruojančių DNR fragmentų, kurie

amplifikuojasi, ir hibridizuojančių prie priešingos spiralės. PCR su dvipusiu specifiškumu nustatant DNR sritis sudėtingame mišinyje ir pasiekiamas naudojant du pradmenis su sekomis, pakankamai specifiškomis šiai sričiai. PCR su vienu specifiškumu naudoja vieną erdvinį specifinį pradžienį ir antrą, kuris gali užimti užplanuotą vietą, esančią visose ar daugelyje atitinkamo mišinio DNR molekulėse. (Loh et al, Csi. 243, 217-220, 1989).

DNR produktai sėkmingai prarastose amplifikacijose yra informacijos apie DNR-sekas šaltiniai (Gylbensten, Biotechniques, 7, 700-708, 1989) ir gali tarnauti tam, kad žymėtos hibridizacijos produktai būtų didesnio ilgio ir didesnio specifiškumo, negu oligonukleotidiniai. PCR su atitinkama seka produktams taip pat galima užplanuoti klonavimą į plazmidinius nešiklius, kurie, kaip atrodo, turi užkoduoto peptidinio produkto charakterį.

Žiurkės SCF kDNR-sekos gavimo pagrindinė strategija pateikta Fig.13A. Mažos strėlytės rodo PCR-amplifikaciją, didelės-DNR eiliškumo reakciją. PCR 90.6 ir 96.2 su kDNR-eiliškumo buvo naudojami žiurkės SCF kDNR nepilnai nukleino rūgščių sekai gauti. Šiose PCR pradžienys buvo sumaišyti oligonukleotidai, pagrįsti aminorūgščių seka parodyta Fig.11. Naudojant informaciją apie seką, gautą iš PCR 90.6 ir 96.2, buvo paruošti unikalūs sekų pradžienys (224-27 ir 224-26, Fig.12A), naudojami vėlesnėse amplifikacijos ir sugrupavimo reakcijose. DNR, turinti 5'-galą kDNR, buvo gauta PCR 90.3, 96.6 ir 625.1 naudojant vieno specifiškumo PCR. SCF baltymo papildoma DNR seka C-gale buvo gauta PCR 90.4. DNR seka koduojamos žiurkės SCF kDNR srities likučiui buvo gauta iš PCR produktų. PCR 630.1, 630.2, 84.1 ir 84.2, kaip aprašyta žemiau šio pavyzdžio C skyriuje. Technologija, naudojama gauti žiurkės SCF kDNR aprašyta žemiau.

RNR ruošė iš BRL ląstelių, kaip aprašyta Okajamos ir kt., Meth.Enzym. 154, 3-28 (1987). PolyA+RNR buvo išskirta oligo (T) celiuliozinės kolonos pagalba, aprašyta Jakobsono Meth in Enzym, 152 t., 254-261 (1987).

Pirma spiralinė kDNR buvo susintetinta naudojant 1 mg BRLpolyA+RNR kaip šabloną ir (dT) 12-18 kaip pradžienį, teikiamą fermento Mo-MLV revers-transkriptazės (Bethesda Research Lab). RNR spiralinė degradacija vyko su 0.14 M NaOH 84°C temperatūroje 10 min. arba inkubuojant verdančio vandens vonioje 5 min. Tirpalo

neutralizacijai pridėjo amonio acetato perteklių; kDNR iš pradžių ekstrahavo fenoliu/chloroformu, po to chloroformu/izoamilo alkoholiu ir išsodino etanoliu. Esant galimybei naudoti oligo (dC)- pradmuo PCR reakcijoje turintis vienpusinį specifiškumą 3'-galui kDNR alikvotos su terminaline transferaze iš veršiuko skydliaukės (Boeringer Mannheim) buvo pridėtas poli (dG) -"uodega", kaip anksčiau aprašyta (Deng et al, Meth.Enz., 100, 96-103, 1983).

Paskutiniuose aprašymuose, jeigu specialiai neaptarta, denatūraciją kiekviename PCR cikle vykdė 1 min., 94°C; prailginimą-3 ar 4 min. 72°C. Aneliavimo temp. ir trukmė varijavo iš PCR į PCR, dažnai priimant kompromisą tarp dviejų PCR. Mažinant pradmens koncentraciją siekiant kad susikauptų mažiau medžiagos su pradmeniu (Watson, Amplific., 2, 56, 1969), buvo naudojamos didesnės aneliavimo trukmės; esant PCR didelei produkto koncentracijai didinant išeigą, naudojama mažesnė trukmė ir didesnė pradmenų koncentracija.

Nustatant aneliavimo temperatūrą, pagrindinis faktorius buvo pradmens Td sujungimo įvertinimas ir tikslai. (Suggs et al, Daylopmen.Biol.Using Purified Genes, Brown, D.D., Fox, C.F. Acad, NY, 683-693, 1981). Čia naudojamus fermentus gavo iš tiekėjų: Stratagene, Promega, arba Perkin-Elmer Cetus. Reakcijos surišėjai buvo naudojami pagal tiekėjų rekomendacijas. Amplifikacijas vykdė arba Soy Tempcycle arba Perkin-Elmer Cetus DNR thermosus. SCF kDNR fragmentų amplifikaciją paprastai vykdė agarų gelio pagalba esant etidiumbromidui ir stebėjo DNR jungtis fluorescencija, stimuliuojant UV spinduliais. Kai kada, kai buvo laukiami maži fragmentai, PCR produktus analizavo naudojant elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje. Patvirtinti tam, kad stebimos jungtys yra kDNR fragmentai, buvo stebimi atitinkami jungčių sekančių amplifikacijų su vienu ar daugiau viduje esančių pradmenų. Galutinis patvirtinimas gautas dideksi-sutvarkymu (Sanger et al, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 74, 5463-5467, 1967) PCR produkto ir tuos produktus palyginant su informacija apie SCF peptidinę seką.

Pirmuose PCR eksperimentuose naudojo maišytus oligonukleotidus, SCF baltymo sekos pagrindu (Gould, Proc.Natl.Acad.Sci, USA, 86, 1934-1938, 1989. Žemiau pateiktas PCR amplifikacijos aprašymas, kuri buvo atlikta norint gauti informaciją apie DNR sekas žiurkės kDNR, užkoduotų aminorūgščių, nuo 25 iki 162.

PCR 90.6 BRL kDNR aplifikavo su 4 pikomoliais 222-11 ir 223-6 kiekvieno po 20 ml. PCR 90.6 produkto alikvotą tyrė elektroforetiškai agarose gelyje ir pastebėjo jungtį artimą norimam dydžiui. 1 ml PCR 90.6 produkto amplifikuotas toliau su 20 pM 222-11 ir 223-6 pradmenų, kiekvieno po 50 ml 15 ciklų, aneliavo 45°C. Dalis šio produkto toliau buvo amplifikuota 25 ciklais esant 222-11 ir 219-25 pradmenims (PCR 96.2), ir tas davė vienodą jungtį agarose gelio elektroforezėje. PCR 96.2 produkto asimetinė amplifikacija su tais pačiais pradmenimis davė matricą, kuri buvo sutvarkyta. Toliau SCF 96.2 produkto sekas selektyviai amplifikavo naudojant PCR amplifikacijos produktą su 222-22 ir 219-21 pradmenimis. Šios PCR produktą naudojo kaip etaloną ir pavyzdžius, žymėtus izotopais.

Siekiant atskirti žiurkės SCF kDNR 5'-galą, (dC)_n turinčias sekas, priimtinas poli-(dG)-"galų" kDNR, naudojo kaip nespecifines. PCR 90.3 turėjo (dC)₁₂ (10 pM) ir 223-6 (4 pM) kaip pradmenis ir BRL kDNR kaip etaloną. Reakcijos produktas pasireiškė kaip agregatas su labai dideliu molek. sv., agarose gelio elektroforezėje likdamas arti užnešimo ribos.

1 ml produkto tirpalo buvo amplifikuotas su 25 pM (dC)₁₂ ir 10 pM 25 ml 223-6 15 ciklų, aneliuojamų 45°C. 0.5 ml šio produkto po to buvo amplifikuota 25 cikluose su 219-25 ir 201-7 pradmenimis (PCR 96.6). Fig.12C parodyta 201-7 seka. Agarose gelio elektroforezėje jungties nebuvo. Dar po 25 PCR ciklų (aneliavimas 40°C) buvo viena matoma jungtis. Po blokingo buvo matoma viena ryški hibridinė jungtis. Papildomi 20 PCR ciklų (625.1), (aneliavimas 45°C) buvo vykdomas, naudojant 201.7 ir 224-27 pradmenis. Po asimetrinės PCR amplifikacijos, buvo sutvarkymas, ko pasekoje gavo seką, ilgesnę, negu N-galas peptidinio koduoto pre-SCF.

Šią seką naudojo oligonukleotidų pradmens 227-29, turinčio 5'-galo koduotą žiurkės SCF kDNR dalį, planavimui.

Panašiai, 3'-DNR seka, besibaigianti 162 aminorūgštimi, buvo gauta PCR 90.4 sutvarkymu (žr., Fig.13A).

B. RCF genominės DNR klonavimas

PCR rezultatai, išplečiant koduoto žiurkės SCF kDNR, kaip aprašyta A sk., buvo naudojami sudarant duomenų bazę su žiurkės genomo sekomis (gauti iš

ClonTech.Lab., No RI1022j). Buvo sukurta bakteriofago pradmenų biblioteka naudojant DNR, gauta iš žiurkės *S. praque* Dawley suaugusio patino. Biblioteka turi 2.3×10^6 nepriklausomų klonų su vidiniu vidutiniu dydžiu 16kD.

PCR naudojo sukuriant ^{32}P -žymes, naudojamas bibliotekos sudarymui. PCR (Fig.13A) atliko reakcijoje su 16.7 mM ^{32}P (alfa)-dATP, 200 mM dGTP, 200 mM dCTP, 200 mM dTTP, reakcijos buferiu, pateiktu Pertin Elmer Cetus, Tag-polimerazę (Pertin Elmer Cetus) 0.05 vnt/ml, 0.5 mM 219^{-2} 6, 0.05 mM 223-6 ir 1 ml etalono 90.1, turintis pradmenų prisijungimo vietas. PCR2 vykdė analogiškais sąlygomis, išskyrus tai, kad pradmenys ir etalonas buvo pakeisti - naudojo 0.5 mM 222-11, 0.05 mM 219-21 ir 1 ml etalono, gauto PCR 96.2.

Apie 10^6 bakteriofagų patalpino į lėkšteles, kaip aprašyta Maniatis et al, 1982. Plokštelės buvo perneštos ant filtrų Gene Screen Plus (22x22 cm; Nen/Du Pont), kurie buvo denatūruoti, neutralizuoti ir išdžiovinti pagal tiekėjo instrukciją. Kiekvieną lėkštelę filtravo du kartus.

Filtrus prehibridizavo 1 M NaCl, 1% jaučio serumo albuminu, 0.1% fikoliu, 0.1% polivinilpirolidonu (hibridizavimo tirpalas) 16 val., 65°C ir saugojo -20°C. Filtrus pernešė į šviežią hibridizacijos tirpalą su ^{32}P žymėtu PCR produktu prie 1.2×10^5 cpm/ml ir hibridizavo 14 val. 65°C. Filtrus plovė 0.9 M NaCl, 0.09 M natrio citratu, 0.1% SDS, pH 7.2 (plovimo tirpalas) 2 val. kambario temp., po to - antras plovimas 30 min. šviežiam vandens tirpale 65°C. Bakteriofagų klonai lėkštelėse atitinkantys radiaktyvias dėmes, buvo pašalinti iš lėkštelių ir sortiruoti su PCR1 ir PCR2 pvz.

DNR iš teigiamų klonų buvo paveikta endonukleazėmis BamHI, SphI ar SstI ir gauti fragmentai subklonuoti (Fig.19) ir iš eilės sutvarkyti. Sutvarkymo schema žiurkės genominio SCF DNR parodyta Fig.14A. Piešinio viršutinėje dalyje - žiurkės genominio SCF DNR. Tarpai linijose - sritys, kurios nebuvo sutvarkytos. Dideli boksai - SCF geno koduotų dalių aksonai. Strėlėmis nurodytos sritys, kurios buvo sutvarkytos ir naudojamos žiurkės geno SCF sekų jungtims. Žiurkės SCF seka parodyta Fig.14B.

Naudojant PCR1 žiurkės genomo bibliotekai, buvo išskirti klonai, atitinkantys koduotų SCF aminorūgštimis nuo 19 iki 176, aksonus. Norint gauti klonus aksonams, 19 aminorūgščių kodavimo srityje atrinkta biblioteka naudojant oligonukleotidų 228-30 mėginius. Tas pats filtrų rinkinys, kaip ir PCR1, buvo prehibridizuotas ir hibridizuotas

tirpale su ^{32}P žymėtu oligonukleotidu 228-30 (0.03 pM/ml) 50°C 16 val. Filtrus plovė 30 min. kambaro temperatūroje praplovimo tirpale, po to antras praplovimas šviežiame vandeniniame tirpale 15 min., 45°C. Bakterofagų klonai buvo išimti iš lėkštelių ir sortiruoti su 228-30 pvz. DNR iš teigiamų klonų buvo paveikta endonukleazėmis ir subklonuota. 228-30 tyrimai įgalino gauti klonus, atitinkančius koduotas amino rūgštis nuo 20 iki 18 aksonuose.

Buvo keletą kartų bandyta išskirti klonus, atitinkančius aksonus (a), turinčius 5'-netransliuotas sritis ir aminorūgščių nuo -25 iki -21 kodavimo sritis. Šioje srityje žiurkės SCF klonai nebuvo išskirti.

C. Žiurkės kDNR klonavimas ekspresijai žinduolių ląstelėse

Tam, kad įsitikinti ar gali žiurkės SCF aktyvus polipeptidinis produktas būti išreikštas ar sekretuojamas žinduolių ląstelių, buvo naudotos žiurkės SCF (SCF¹⁻¹⁶², SCF¹⁻¹⁶⁴) ir SCF¹⁻¹⁹³ baltymo ekspresijos sistemos, žinomos iš geno transliacijos, (Fig.14C).

Šiuose eksperimentuose naudojamas ekspresijos pernešėjas turi pVC119, SV40 ir HTLV sekas. Pernešėją naudojo autonominėje replikacijoje žinduolių ir *E.coli* ląstelėse ir egzogeninės DNR ekspresijai, kontroliuojant virusinės DNR sekai. Šis pernešėjas pažymėtas V19.8, esantis *E.coli* DH5, pteiktas Amer. TypeCultureCollect., 12301 Parklawn Drive Rockville, M (ATCC#68124). Šis pernešėjas yra pSVDM19 darinys, aprašytas JAV patente 4 810 643.

kDNR žiurkės SCF buvo įvesta į plazmidinį nešiklį V19.8. kDNR seka parodyta Fig.14C. Šioje konstrukcijoje naudojo DNR, sinezuotą PCR 630.1 ir 630.2 reakcijose, kaip parodyta Fig.13A. Šios PCR yra nepriklausomos amplifikacijos ir naudojo sintetinius oligonukleotidų pradmenis 227-29 ir 227-30. Sekos šiems pradmenims buvo gautos iš kDNR, generuotos PCR, kaip aprašyta šio pvz. A skyriuje. 50ml reakcijos mišinys buvo iš reakcijos buferio (iš rinkinio Perkin Elmer Cetus), 250 mM dATP, 250 mM dCTP ir 250 mM dGTP, 250 mM dTTP, 200 mg oligo (dT), 1 pM 227-29, 1 pM 227-30 ir 2.5 vnt Tag-polimerazės (Perkin Elmer Cetus). kDNR amplifikavo per 10 ciklą, denatūravimo temp. 94°C 1 min., užgrūdinimo temp. 37°C 2 min., prailginimo temp. 72°C 1 min. Po šių PCR ciklų į kiekvieną reakciją pridėjo po 10 pM 227-29 ir 10 pM 227-30. Amplifikaciją vykdė 30 ciklų tomis pačiomis sąlygomis, išskyrus tai, kad aneliavimo

temp. buvo iki 55°C. PCR produktai veikti endonukleazėmis Hind III ir SstII. V19.8 analogiškai veikė HindIII ir SstII ir, vienu atveju, plazmidinį nešiklį veikė veršiuko skrandžio fosfataze, kitu atveju-izoliavo didelį fragmentą ardyto produkto iš agarinio gelio. kDNR ligavo V19.8 naudojant polinukleotidinę ligazę T4. Ligavimo produktus transformavo į kompetentinį kamieną. *E.coli* DH5, kaip aprašyta (Okajama et al, Supra, 1987). DNR gauta iš bakterijų kamienų ir sutvarkyta pagal Sangeria didezoksi metoda. Fig.17 parodyta V19.8. Šias plazmides naudojo žinduolių ląstelių transfekcijoje, kaip parašyta 4 ir 5 pvz.

Žiurkės SCF1-164 ekspresijos pernešėjas buvo sukonstruotas pagal metodą, naudojamą SCF1-162, kur kDNR susintetinta PCR amplifikacijos pagalba ir įvesta į V19.8. kDNR buvo susintetinta PCR amplifikacijoje su V19.8, turinčiu SCF¹⁻¹⁶² kDNR (V19.8:SCF¹⁻¹⁶²) kaip matricą, 227-29 kaip pradmuo geno 5'-galui ir 237-19, kaip pradmuo geno 3'-galui. Dublikacijos reakcija (50 ml) turėjo reakcinį buferį lx, 250 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5 vnt Tag polimerazės, 20mg V19.8:SCF¹⁻¹⁶² ir po 20 pM pradmens. kDNR amplifikavo 35 cikluose 94°C 1 min., 55°C 2 min., 72°C 2 min. Gautus produktus veikė endonukleaze HindIII ir SstII ir įterpė į V19.8. pernešėjas turi aminorūgščių SCF kodavimo sritį nuo -25 iki 164. kDNR 193 aminorūgščiai (žiurkės SCF¹⁻¹⁹³ numatomas iš DNR sekų transliacijos, Fig.14C) taip pat buvo įterpta į V19.8, analogiškai SCF¹⁻¹⁶². Čia naudojama kDNR susintetinta PCR reakcijose, 84.1 ir 84.2 (Fig.13A) su 227-29 ir 230-25 oligonukleotidų pagalba. Dvi amplifikacijos reakcijos prasideda nuo skirtingų RNR preparatų. Pagal šio pavyzdžio A skyrių, PCR reakcijoje buvo gauta seka 227-29; 230-25 gauta iš žiurkės genomo DNR (Fig.15B). Reakcijos (50 ml) turėjo reakcijos buferį lx, (Perkin Elmer Cetus), po 250 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 200 mg oligo (dT)/ 10 pM 227-29, 10 pM 230-5 ir 2.5 Tag (Perkin Elmer Cetus).

kDNR amplifikavo 5 ciklais, 94°C 1.5 min., 50°C 2 min., 72°C 2 min. Po šių ciklų amplifikacija buvo vykdoma dar 35 ciklus tokiomis pat sąlygomis, išskyrus tai, kad aneliavimas buvo 60 °C. PCR amplifikacijos produktus veikė endonukleazėmis HindIII, SstII; V19.8 DNR veikė HindIII ir SstII iš agarinio gelio išskyrė didelį fragmentą. kDNR ligavo iki V19.8 polinukleotidinės ligazės T4 pagalba. Ligandus transformavo į kompetentinį *E.coli* kamieną ir sutvarkė DNR, paruoštą iš individualių klonų. Šias plazmides naudojo žinduolių ląstelių transfekcijai 4 pvz.

Žmogaus CSF kDNR PCR produkto amplifikacija ir sutvarkymas

Žmogaus SCF kDNR gavo iš hepatomos HepS2 ląstelių linijos (ATCC HB 8065) PCR amplifikacijos pagalba, parodyta Fig.13B. Amplifikaciją vykdė su pradmenimis, kurių seka buvo gauta iš žiurkės SCF .

RNR ruošė pagal Maniatis et al, (1982). PoliA+RNR gavo naudojant oligo (dT) celiuliozę pagal tiekėjo (Collab.Res. Inc) instrukciją.

Pirmos grandinės kDNR ruošė kaip ir BRL kDNR, išskyrus tai, kad sintezę iniciavo 2 mM oligonukleotidu 228-28, parodytu Fig.12C, turinčiu trumpą 3' seką, prijungtą prie ilgesnės unikalios sekos. Dalis unikalios sekos 228-28 apsprendžia tikslinę vietą PCR amplifikacijai su 228-29 pradmeniu. Žmogaus kDNR sekos giminingos žiurkės kDNR sekoms, buvo amplifikuotos iš HepG2 per PCR, naudojant 227-29 ir 228-29 pradmenis (PCR 22.7, žr. 13B pieš.); 15 aneliavimo ciklų 60°C, po to 15 ciklų 55°C.

Agaro gelio elektroforezė neišryškino jungčių, tik dėmės heterogenines DNR dydžio atžvilgiu. Sekanti PCR buvo vykdoma su 1 ml PCR 22.7 produkto, naudojant žiurkės SCF 222-11 ir 228-29 pradmenis (PCR 24.3; 20 aneliavimo ciklų 55°C). Agaro gelyje vėl buvo heterogeninės DNR dėmės. Dvipusė specifinė PCR amplifikacija PCR 24.3 produktų su 222-11 ir 227-30 pradmenimis (PCR 25.10, 20 ciklų) padidino produkto ordinarinę pagrindinę jungtį iki žiurkės SCF kDNR PCR produkto reikšmės. Asimetrinės PCR (PCR 33.1) DNR, naudojant 224-24 pradmenį, produkto sutvarkymas davė apie 70 žmogaus SCF sekų.

Amplifikacija PCR 22.7 1 ml produkto su 224-25 ir 228-29 pradmenimis (PCR 24.7, 20 ciklų), o po to su 224-25 ir 227-30 pradmenimis (PCR 41.11) davė vieną pagrindinę tokio pat dydžio jungtį, kaip ir žiurkės SCF atveju, ir po asimetrinės amplifikacijos (PCR 42.3) davė didelio homogeniškumo sekas, lyginant su žiurkės SCF sekomis, naudojant 224-24 pradmenį. Buvo susintetinti unikalūs oligonukleotidai, planuoti žmogaus SCF kDNR; jų sekos pateiktos Fig.12B.

Norint gauti PCR generuotas, koduotas žiurkės SCF sekomis, kurias naudojo tiriant ekspresiją ir aktyvumą, žmogaus SCF dublikatą, buvo vykdoma PCR su 227-29 ir 227-30 pradmenimis 1 ml PCR 22.7 produktui, 50 ml tūrio (PCR 39.1). Amplifikaciją vykdė SoyTempcycter.

Kadangi buvo nežinomi neatitikimai tarp žmogaus SCF kDNR ir su unikaliu 227-30 pradmeniu žiurkės SCF, pirmuose trijuose cikluose aneliavimą naudojo tik 37°C, po to 55°C. Pasirodė aiški tokio pat dydžio jungtis (apie 590 Dp), kaip ir žiurkės homologo, papildomai amplifikavo ištirpintas nedideles porcijas PCR 39.1 ir PCR su priedais (PCR 41.1). Dėl to, kad PCR 41.1 produktuose buvo daugiau kaip viena jungtis, sekancias PCR darė su tikslu nustatyti bent dalį sekų klonavimui. Ordinarinė intensyvi jungtis pastebėta po PCR 23 ciklų su 231-27 ir 227-29 pradmenimis (PCR 51.2). Asimetrinės PCR su 227-29 ir 231-27 ir sutvarkymas patvirtino žmogaus SCF kDNR sekų buvimą. PCR 41.1 SCD kDNR klonavimą į V19.8 vykdė kaip aprašyta C skyriuje, žiurkės SCF¹⁻¹⁶² PCR fragmentams. DNR iš atskirų bakterinių klonų sutvarkyta pagal Sangerio didezoksi metodą.

E. Žmogaus SCF genominės DNR klonavimas

Mėginį PCR7, sudarytą iš PCR amplifikuotos kDNR, žr. Fig.13B, naudojo bibliotekos sudarymui, turinčios žmogaus genomines sekas. Ribomėginį, tinkamą daliai žmogaus SCF kDNR (žr. žemiau), naudojo teigiamiems trombocitams persėti. PCR7 mėginį paruošė pradedant nuo PCR 41.1 produkto (žr. Fig.13B). PCR 41.1 produktą amplifikavo su pradmenimis (PCR 58.1). PCR 58.1 produktą skiedė 1000 kartų 50 ml reakcijos mišinio, turinčio 20 pM 233-13 ir amplifikavo 10 ciklų. Pridėjus 10 pM 227-30, PCR pailgino dar 20 ciklų. Pridėjo papildomai 80 pM 233-13, reakcinį tūrį padidino iki 90 ml ir PCR pailgino 15 ciklų. Reakcijos produktus skiedė 200 kartų 50 ml ir pridėjo 20 pikoM 231-27 ir 20 pikoM 233-13, ir PCR tęsė 35 ciklų aneliavimo temp. 48°C 96.1 reakcijoje. Žymėtos P-32 PCR vykdė panašiai, išskyrus: PCR 96.1 50 ml tūryje 100 kartų skiedė; 5 pikoM 231-27 naudojo kaip vienintelį pradmenį; 45 PCR ciklus vykdė 94°C 1 min., 48°C 2 min., 72°C 2 min.

Ribomėginiu 1 buvo ³²P žymėta RNR, tinkanti nukleotidų 2-436hSCF DNR-sekoms, parodytoms Fig.15B. Sudarant pernešėją, PCR 41.1 (Fig.13B) produktą DNR veikė su HindIII ir EcoRI, klonavo į polilinkerį (polyLinker) plazmidinio nešiklio pGEM3 (Promega, Madison, Wisconsin). Rekombinantinis pGEM3:SCF plazmidinės DNR veikė su HindIII. ³²P žymėtas mėginys I gautas iš plazmidinės DNR, transkribuojant polimeraze T7 RNR pagal instrukcijas, pateiktas firmos Promega. Reakcija apėmė (3 ml) 250 mg

plazmidinę DNR ir 20 mM ^{32}P -STR (katalog.No NEG-008H, NewEngland Nuclear (NEN) su papildoma nežymėta STR.

Žmogaus genomine biblioteka buvo gauta iš stratogeno (LaJolla, CA; cat.No 946203). Biblioteką konstravo bakterofaginiame nešiklyje LambadaFix II, naudojant DNR, gautą iš kaukaziško ežio placentos. Biblioteka turėjo 2000000 pirminių dėmių (plagues), su vidiniu vidutiniu dydžiu daugiau kaip 15kD. Apie 1000000 bakteriofagų patalpino į lėkštelę, kaip aprašyta Maniatis ir kt.(Supra, 1962). Krūvius pernešė ant Gene Screen Plus filtrų (22 kv.cm; NEN Dupont) pagal instrukcijas. Kiekvienai lėkštelei buvo du filtravimai. Filtrus prehibridizavo 6xSSC (0.9 M NaCl, 0.09 M natrio citrato, pH 7.5), 1% SDS 60°C temperatūroje. Hibridizavo filtrus šviežiame tirpale 6xSSC, 1% SDS, turinčiame ^{32}P žymėtą PCR7 mėginį 200000 srm/ml ir hibridizavo 20 val. 62°C.

Filtrus plovė 6xSSC, 1% SDS 16 val. 62°C. Bakterofago mėginius, atitinkančius radioaktyvias dėmes, pašalino iš lėkštelės persortiruotos su PCR7 ribomėginiu I tokiu būdu: Filtrus prehibridizavo 6xSSC, 1% SDS ir hibridizavo 18 val. 62°C, 0.25 M Na_3PO_4 , (pH 7.5), 0.25 M NaCl, 0.001 M EDTA, 15% formamido, 7% SDS ir 1×10^6 srm/ml. Filtrus plovė 6xSSC, 1% SDS 30 min. 62°C. DNR iš teigiamų klonų veikė endonukleazėmis BamH, SphI ar SstI ir gautus fragmentus subklonavo pNC119.

PCR 7 mėginio pagalba gavo kloną, turintį koduojamą amino rūgščių nuo 40 iki 176, aksoną ir šį kloną perkeltą į ATCC (depozitas#40681). Norint gauti kloną papildomiems aksonams SCF, žmogaus genomine biblioteka sortiruota ribomėginiu 2 ir oligonukleotidų mėginiu 235-29. Sortiravo kaip paprastai, išskyrus: hibridizaciją su 235-29 mėginiu vykdė 37°C ir praplovimai buvo po 1 val. 37°C ir 44°C. Teigiami klonai sortiruoti su ribomėginiu 2, 3 ir oligonukleotidų mėginiu 235-29 ir 236-31. Ribomėginius 2 ir 3 gavo naudojant analogišką ribomėginį 1, išskyrus: rek. pGEM3:hSCF plazmidinės DNR veikė endonukleaze P ir (ribomėginys 2e ar Psi (ribomėginys 3) ir (d) ribomėginio 3 sintezei naudojo SP6 RNR polimerazę (Promega).

Fig.15A parodyta strategija, naudota žmogaus genomines DNR sutvarkymui.

F. Žmogaus SCF kDNR 5'-galo seka

PCR 9 produktų sutvarkymas, inicijuotas dviem genospecifiniais pradmenimis, duoda seką srities, apribotos pradmenų 3'-galais. PCR 9, kaip parodyta 3 A pvz., gali

duoti flankiruotų sričių sekas. Vienpusė PCR buvo naudota žmogaus SCF 5'-netransliuotos srities sekų išplėtimui.

Pirmos linijos kDNR gavo iš poli (A+) RNR iš žmogaus vėžio cistos ląstelių linijos 5637 (ATCC HTB 9), naudojant oligonukleotidą 228- (Fig.12C), kaip pradmenį, kaip aprašyta 3 pvz. Šios DNR su 6 liekanomis pailginimas, sekantis po PCR amplifikacijos su (dC)_n pradmenimis, nedavė kDNR fragmentų išplėtimo.

Iš PCR produktų antros linijos sintezės, inicijuotos 228-28 oligonukleotidu (Fig.12C), gavo mažai informacijos apie sekas. Bet turinti "uodegą" pirmos linijos 5637 kDNR, (apie 50 ng) ir 2 pikoM 228-28, inkubavo su Klionovo polimeraze ir po 0.5 pikoM kiekvieno dATP, dCTP, dGTP ir dTTP prie 10-12°C 30 min., į 10 ml 1xNick-translation buferio (Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab., 1982).

Gautos kDNR amplifikacija su 228-29, kombinacijoje su SCF-pradmenimis (tokia tvarka: 235-30, 233-14, 236-31 ir 235-29) davė sudėtingus mišinius, turinčius dėmių agarų gelyje, išvaizdą. SCF fragmentų praturtėjimas buvo: specifinės produkto jungties intensyvumas stebimas, kai palyginamieji produktai buvo amplifikuoti dviem pradmenimis (227-29 ir 235-29), pvz., duodant produktą apie 150 dr. Bandymai paimti eilę produktų pagal individualius dydžius, išskiriant dėmes iš agarizuoto gelio ir preamplifikuojant PCR, dauguma atvejų nebuvo gauta tiksliai apibrėžta jungtis, turinti SCF sekas.

Viena PCR 16.17 reakcija, turinti tik 235-29, įtakojo jungties augimą, kuri išaugo dėl iniciavimo 235-29 pagalba nežinomoje vietoje, 5' koduojančios srities priedus, kaip parodyta žemėlapyje Fv II ir Fst I su fermentais ir PCR analize su pradmenimis. Šį produktą išvalė iš gelio ir peramplifikavo su 235-29, sutvarkė pagal Zangerio didezoksi metodą, naudojant ³²P-žymėtą 228-30 pradmenį. Gauta seka buvo bazė konstruojant 254-9 oligonukleotidą (Fig.12B). Naudojant 3'-nukreiptą pradmenį vėlesnėse PCR kombinacijoje su 5'-nukreiptais SCF pradmenimis, buvo gautos norimų dydžių sekos. Sutvarkius pagal Zangerį tokius PCR produktus, buvo gauti nukleotidai su 180 iki 204 Žmogaus SCF kDNR sekomis (Fig.15C).

Norint gauti didesnę seką 5'-gale hSCF kDNR, buvo paruošta kDNR pirmos linijos iš 5637 poli A+RNR (apie 300ng), naudojant SCF-specifinį pradmenį (2 pikomoliai 233-14) 16 ml mišinio, turinčio 0.2 vnt MMLU reversinės transkriptazės ir 500 mM kiekvieno

dNTP. Po ekstrakcijos fenoliu/chloroformu ir chloroformu ir išsodinimo etanoliu (iš 1 M amonio acetato), nukleino rūgštys buvo suspenduotos 20 ml vandens, patalpintos į verdančio vandens vonią 50 min., po to atšaldytos ir pailgintos terminaline transferaze esant 80 mM dATP CaCl_2 -turinčiame buferyje (Dengand W, Meth.Enzim., 100, 96-103). Pirmos linijos kDNR su (dA)n-„uodega“ produktas buvo išvalytas fenolio-chloroformo ekstrakcija ir etanolio išsodinimu ir perresuspenduotas 20ml 10 mM Tris pH 8.0 ir 1 mM EDTA. Žmogaus SCF kDNR 5' fragmentų, apie 20 ng svorio (dA)n- 5637 praturtinimą ir amplifikaciją vykdė taip: pirmus vienpusės PCR 26 ciklus vykdė esant SCF-pradmeniui 236-31 arba pradmenų mišiniui, turinčiam (dT)n-sekas ar kartu su 3' galu, pvz., pradmuo 221-1 ar mišinys 220-3, 220-7 ir 22011 (12C pieš.). Šių PCR produktai (1 ml) buvo po to amplifikuoti antroje PCR, kur buvo 221-12 ir 235-29. Apie 370 bp produkto pagrindinė jungtis stebėta kiekvienu agaro gelio atveju. Gelio mėginys, turintis dalį šios jungties, buvo išimtas Pastero pipetės galiuku ir perneštas į mažą mėgintuvėlį. Pridėjo 10 ml vandens ir tirpdė kaitinimo bloke, kur temp. 84°C.

PCR su 221-12 ir 235-29 (8 pikomoliai kiekvienoje) inokuliuota 40 ml su 2 ml ištirpinto gelio. Po 15 ciklų, analizuojant ant agaro gelio, stebėjo lengvą difuzinę jungtį, apie 370 bp. Vykde asimetrinius PCR siekiant sudaryti matricas su viršutiniais ir apatiniais siūlais: kiekvienai reakcijai 4 ml produkto ir 40 pikomolių 221-12 ar 235-29 pradmenų, 100 ml tūrį veikė 25 PCR ciklais (1 min., 95°C; 30 sek., 55°C; 4 sek., 72°C). Tiesioginis PCR produktų mišinių, inicijuotų 221-12 (po standartinės ekstrakcijos ir išsodinimo etanoliu) su ^{32}P -žymėtu 262-13 (Fig.12B) sutvarkymas, įgalino gauti 5'seką nuo nukleotido 1 iki 179 (Fig.15C).

G. Žmogaus genomines DNR pirmojo koduojančio SCF aksono srityje amplifikacija ir sutvarkymas

Žmogaus genomines bibliotekos su SCF oligonukleotidų mėginiais atranka nedavė klonų, turinčių pirmojo koduojančio aksono garsią sritį, po ko buvo mėginta naudoti vienpusės PCR techniką šio aksono supančių genomo sekų, amplifikacijai ir klonavimui.

Pradmenų išplėtimą denatūruotoje žmogaus placentinėje DNR (gauta iš Sigmos) vykdė su DNR polimeraze I (Klionovo fermentas, didelis fragmentas) naudojant ne SCF

pradmenis 228-28 ar 221-11 žemoje temperatūroje (12°C), kas įtakoja iniciavimą daugelyje skirtingų centrų. Kiekviena reakcija po to buvo skiesta 5 kartus Tag I DNR polimerazės buferyje, kur buvo Tag I polimerazė ir 100 mM kiekvieno dNTP, pailginimas buvo 10 min., 72°C. Produktas buvo praturtintas SCF oligonukleotais pirmojo aksono (kaip 254-9), PCR reakcijoje su neSCF pradmenimis (228-29 ir 221-11). Elektroforezė parodė, kad dauguma produktų buvo trumpi (<300 bp). Kad pailginti, kiekvieno tarpo gelyje dalis buvo išpjauta ir eliuota. Po išsodinimo etanolio ir resuspendavimo vandenyje, iš gelio išvalyti produktai buvo klonuoti pGEM4 dariniui, turinčiam Stil dalį, kaip Hind III fragmentą iki Stil.

Buvo atsėtos kolonijos su ³²P-žymėtais SCF pirmojo aksono oligonukleotidais. Kelios teigiamos kolonijos buvo identifikuotos Zangerio pagalba. Seka, kuri tęsiasi žemyn nuo pirmo aksono per atitinkamą jungtį eksonitrono į kitą introną, parodyta Fig.15B.

H. SCF kDNR, koduojančio pelių, beždžionių ir šunų sritis, amplifikacija ir sutvarkymas

Pirmo pakrovimo kDNR ruošė iš bendros RNR ar poli A+RNR iš beždžionės kepenų (gauta iš Clontechi) ir ląstelių linijos NIH-3T3 (pelės, ATCC CRL 1858), ir D17 (šuns, ATCC CCL 183). DNR sintezėje naudojamu pradmeniu buvo arba nespecifinis 228-28, ar SCF-pradmuo (227-30, 237-19, 237-20, 230-25 ar 241-6). PCR amplifikuota su 227-29 ir viena iš 227-30, 237-19 ar 237-20 davė laukto dydžio fragmentą, kuris buvo sutvarkytas arba tiesiai, arba klonuojant į V19.8 ar pGEM.

Papildomos sekos prie SCF kDNR 5' galo gautos iš PCR, naudojant SCD specifinį pradmenį, 254-9 ir 228-29 kombinaciją.

Papildomas sekas prie 3' galo gavo po 230-25 DNR, (pelės atveju) ar 241-6 inicijuotos kDNR (beždžionės atveju) su 230-25 ar 241-6, ir 3' nukreipto SCF-pradmeniui, PCR. Panašiais atvejais, amplifikuojant DNR D17, negavo SCF PCR produktų jungčių. Nespecifinis 228-28 buvo naudojamas pirmo pakrovimo iš bendros RNR D 17 sintezės inicijavimui, ko pasekoje susidaręs mišinys buvo praturtintas SCF sekomis, naudojant PCR 3'galo SCF pradmenis, 227-29 ar 225-31 kombinacijoje su 228-29. Produktų mišinį klonavo į pGEM4 darinius (Promega, Madison, Wisconsin),

turinčius Stil sritį bukajame fragmento gale. Gauta heterogeninė biblioteka buvo atsėta su radiožymėtu 237-20, keletas teigiamų klonų buvo sutvarkyta, kas davė šuns SCF3'-galo sekas. Žmogaus (Fig.42), beždžionės, šuns, pelės ir žiurkės SCF subrendusių baltymų amino rūgščių sekos pateiktos Fig.16.

Žinomos SCF-aminorūgščių sekos yra homologiškos per visą jų ilgį. Identiški sutapimai signalinių peptidinių sekų yra subrendusio baltymo amino galo koduojamose srityse, lyginant su žiurkės SCF. Ji pažymėta No 1. Šuns kDNR seka turi neapibrėžtą aminorūgščių seką, kas yra valino rezultatas 129 kodone. Žmogaus, beždžionės, šuns, pelės aminorūgščių sekos pateikiamos be kokių nors įtarpų ar iškirpimų. Šuns aminorūgščių seka turi vieną papildomą liekaną 130 pozicijoje. Žmogaus ir beždžionės skiriasi tik vienoje pozicijoje, valino pakeitime (žmogaus) į alaniną (beždžionės) 130 pozicijoje. Numatyta SCF seka iki ar po spėjamo procesinio centro prie 164 liekanos labai pastovi rūšių atžvilgiu.

4 pavyzdys

Rekombinantinio žiurkės SCF ekspresija COS-1 ląstelėse

Pereinamajai ekspresijai COS-1 ląstelėse (ATCC SRL 1650), nešiklis V19.8 (3C pvz.), turintis SCF1-164 ir SCF1-193 genus, transfekuotas dubliuotose 60 mm lėkštelėse (Wigler et al, Cell, 14, 725-731, 1978). V19.8 SCF plazmidė parodyta Fig.17. Kaip kontrolė, nešiklis taip pat buvo transfekuotas. Plaukiojantys ant paviršiaus kultūros audiniai buvo surinkti skirtingais post-transfekcijos momentais ir analizuotas jų biologinis aktyvumas. 4 lentelėje sumuojami rezultatai Hpp-SCF, 5 lentelėje - MC/9³H-timidino duomenys iš tipinių transfekcijos eksperimentų. Biomėginių, plaukiojančių COS-1 ląstelių, transfekuotų tomis plazmidėmis, paviršiuje rezultatai pateikti 4 ir 5 lentelėse; C-galo žiurkės SCF su C-galu aminorūgštis 162 pozicijoje (V19.8 žiurkės SCF1-162), SCF1-162, turinčio glutamino rūgštį 81 pozic. (V19.8 žiurkės SCF1-162 (Glu 81)) ir SCF1-162, turinčio Ala 19 pz. (V19.8, žiurkės SCF1-162 (Ala19)). Aminorūgščių pakaitalais buvo PCR, vykdytos SCF1-162 amplifikacijos, produktai, kaip parodyta 3 pvz. Žiurkės SCF1-162 individualūs V19.8 klonai buvo sutvarkyti ir buvo nustatyta, kad du klonai turi aminorūgščių pakaitalus. Kaip matyti 4 ir 5 lent., rekombinantinis žiurkės SCF aktyvus mėginiuose, naudotuose gamtinio žinduolių SCF išvalyme.

4 lentelė

Paviršiaus COS-1 ląstelių, transfekuotų žiurkės SCF DNR, HPP-SCF tyrimas

Pavyzdys	Tiriamos medžiagos tūris (ml)	Kolonija #/200000 ląst.
V19.8 (be intarpų)	100	0
	50	0
	25	0
	12	0
V19.8 žiurkės SCF1-162	100	50
	50	50
	25	50
	12	50
	6	30
	3	8
V19.8, žiurk. SCF1-162(Glu81)	100	26
	50	10
	25	2
	12	0
V19.8, žiurk. SCF1-162(Ala19)	100	41
	50	18
	25	5
	12	0
	6	0
	3	0

5 lentelė

MC/9³H-timidino duomenys, tiriant paviršiaus COS-1 iš ląst. transfekcijų su žiurkės SCF DNR_i

Pavyzdys	Tiriamos medžiagos tūris (ml)	*)cpm
V19.8 (be intarpų)	25	1.936

	12	2.252
	6	2.182
	3	1.682
V19.8 žiurkės SCF1-162	25	11.648
	12	11.322
	6	11.482
	3	9.638
V19.8, žiurk. SCF1-162(Glu81)	25	6.220
	12	5.384
	6	3.962
	3	1.980
V19.8, žiurk. SCF1-162(Ala19)	25	8.396
	12	6.646
	6	4.566

*) cpm - caunt per minute (impulsų skaičius per min.)

Rekombinantiniai žiurkės SCF ir kt. faktoriai buvo tirti žmogaus CFU-GM (Broxmaer et al., 1977) analize, matuojant normalių kaulų čiulpų ląstelių dauginimąsi; duomenys 6 lent. Paviršiaus COS-1 duomenys po 4 dienų po transfekcijos su V19.8 SCF1-162, kombinacijoje su kitais faktoriais, parodyta 6 lent. Kolonijų skaitlingumas -triplikatinių kultūrų vidurkis.

Rekombinantiniis žiurkės SCF turi sinergetinį aktyvumą normalioms kaulų čiulpų ląstelėms CFU-GM tyrimuose. Eksperimente (6 lent.) SCF veikė kartu su žmogaus GM-SCF, LI-3 ir žm. SCF-1. Kituose tyrimuose, sinergizmas pasireiškė taip pat su G-SCF.

Žmogaus kaulų čiulpų proliferacija po 14 dienų su SCF turėjo įtaką; grupėse buvo <40 ląstelių.

6 lentelė

Paviršiaus COS-1 ląstelių, transfekuotų žiurkės SCF DNR, tikrinimas žmogaus CFU-GM

Pavyzdys	Kolonijų skaičius/1000000 ląst.(±EM)
Fiziolog. tirpalas	0

GM-SCF	7±1
G-SCF	24±1
IL-3	5±1
SCF-1	0
SCF1-162	0
GM-SCF+SCF ¹⁻¹⁶²	29±6
G-SCF + SCF ¹⁻¹⁶²	20±1
IL-3+ SCF ¹⁻¹⁶²	11±1
SCF-1+ SCF ¹⁻¹⁶²	4±0

5 pavyzdys

Rekombinantinio SCF ekspresija kuniško žiurkėno kiaušidžių ląstelėse

Šis pavyzdys taikomas stabiliai žinduolių ekspresijos sistemai, SCF sekrecijai iš CHO (ATCC CCL 61, dhfr-).

A. Rekombinantinis žiurkės SCF

V19.8 (Fig.17) buvo ekspresijos, naudojamos SCF gavimui, nešikliu. Pasirenkamu markeriu gauti stabiliems genams buvo dihidrofolinės reduktazės plazmidėje pDSVE I, genas. pDSVE I(18 pieš.) yra darinys, sukonstruotas pDSVE veikiant sall fermentu ir liguotas iki oligonukleotidų fragmento.

5' TCGAC CCGGA TCCCC 3'
3' GGGCCT AGGGG AGCT 5'

Pernešėjas pDSVE aprašytas US.Nr. 025344 ir 152045, išnašose. Dalis V19.8 ir pDSVE pernešiklio turi ilgas homologijas, įskaitant bakterinį replikacijų šaltinį CO 1EI ir ampilininio pasipriešinimo geną ir 2-40 replikacijų šaltinį. Tai apsprendžia homologinę rekombinaciją transformacijos proceso metu ir, ryšium su tuo, sąlygoja transformaciją.

Kalciofosfatinės nuosėdas V19.8 SCF konstrukcijos ir pDSVE-1 ruošė esant 10 mg pelių DNR nešiklio, naudojant 1 ar 0.1 mg pDSVE-1, kurį veikė endonukleaze FVUI ir 10 mg V19.8 SCF. Kolonijas atrinko pagal geno ekspresiją DHFR iš pDSVE-1. Kolonijas, kurios auga nesant hipoksantino ir timidino, atrinko klonuojančių cilindų pagalba ir išplėtė kaip ląst. linijas. Viršutinio sluoksnio ląsteles tyrė pagal MC/9³ H timidino sugėrimą. Rezultatai pateikti 7 lent.

7 lentelė

Stabilių CHO paviršiaus ląstelių iš transfekuotų žiurkės CHO-DNR ląstelių, MC/9 ^3H timidino sugėrimas

Transfekuota DNR

Transfek. DNR	Tiriamosios kondicinės terpės tūris	Impulsų sk./min
V19.8 SCF ¹⁻¹⁶²	25	33926
	12	34973
	6	30657
	3	14714
	1.5	7160
nėra	25	694
	12	1082
	6	860
	3	672
	1	1354

B. Rekombinantinis žmogaus SCF

SCF ekspresija CHO ląstelėse buvo pasiekta naudojant pDSVRa2 ekspresijos pernešiklį, kuris aprašytas serNo 501904 nuo 1990.03.29, pateikto išnašose. Šis vektorius turi geną selekcijai ir klonų amplifikacijai, paremtai geno DHFR ekspresija. Klonas pDSVRa2 SCF buvo generuotas dviejų stadijų procese. V19.8 SCF veikė fermentu BamHI ir ligavo pGEM3. DNR iš pGEM3SCF veikė HindIII ir Sall ir ligavo pDSRa2, paveiktą HindIII ir Sall. Procesą pakartojo žmogaus genams, užkoduoiant COOH-galą 162, 164 ir 183 aminorūgščių pozicijose (Fig.15C) ir 248 - Fig.42.

Sukurtos ląstelių linijos buvo patikrintos su metotreksatu (Shimre, Meth.in Enzym., 151, 85-104, 1987) esant 10 nm, siekiant padidinti geno DHFR ir SCF geno ekspresiją. Rek. žmogaus SCF ekspresijos lygį analizavo radioimuniniu būdu, kaip 7 pvz., ir/arba kolonijų suformavimo *in vitro*, indukcija, naudojant žmogaus periferinius kraujo leukocitus. Tyrimą atliko kaip aprašyta 9 pvz., (12 lent.), išskyrus, kad inkubacija buvo

esant 20% deguonies, 5% anglies dvideginio ir 75% azoto, esant žmogaus EPO (10 vnt/ml). 8 lent.-tipinio eksperimento rezultatai. CHO klonų žmogaus SCF1-164 ekspresija buvo patalpinta į ATCC (CRL 10557, 1990.09.25) ir pavadinta HiSCF17.

8 lentelė

Kondicinės terpės iš CHO stabilų ląstelių linijos, transfekuotų žmogaus SCF DNR, HPBL kolonijų analizė

Transfekuota DNR	Vidutinis mėginys (ml)	Kolonijų sk/100000
pDSRa2 hSCF ¹⁻¹⁶⁴	50	53
	25	45
	12.5	27
	6.25	13
pDSRa2 hSCF ¹⁻¹⁶²	10	43
	5	44
	2.5	31
	1.25	17
	0.625	21
nėra (CHO kontrolė)	50	4

6 pavyzdys

Rekombinantinio SCF ekspresija *E.coli*

A. Rekombinantinis žiurkės SCF

Šis pavyzdys yra SCF polipeptidų ekspresija *E.coli*, koduojant DNR sekas /Met-1/žiurkės SCF¹⁻¹⁹³ (Fig.14C). Nors baltymų ekspresijoje gali būti naudojamas bet koks nešiklis, naudojama ši DNR plazmidė pCFM 1 156 (Fig.19). Ši plazmidė lengvai konstruojama iš pCFM 836 (JAV patentas Nr.4710473) suardant dvi endogenines NdeI dalis, naudojant polimerazę T4, einančią po buko galo ligavimo ir pakeičiant nedidelę DNR seką tarp dal ir KpnI, dalimis su nedideliais nukleotidais, parodytais žemiau.

5' CGATTTGATTCT AGAAGGAGGAAT AAC ATA TGGTTA ACG CGT TGG AAT
TCGGTAC 3'

3' TAAACTAAGATCTTTCCTCCT TAT TGTATACC AATTGCG CAACCTTAA C 5'

Kontroliavo baltymo ekspresiją pCF M 1156 plazmoje, naudojant sintetinį stimulatorių. Aprūpinant Met-iniciavimo kodoną ir atstatant kodoną, pirmoms trimis žiurkės SCF polipeptido aminorūgščių liekanoms (Glu, Gln, Ile) buvo paruoštas sintetinis oligonukleotidinis linkeris.

5' TATGCAGGA 3'

3' ACGTCCTCTA 5'

su Nde I ir BglII liekanomis. Žiurkės SCF geno nedidelis nukleotidas ir fragmentas buvo įterpti į pCFNI 156 liguojant unikalioje padėtyje Nde I ir SstII plazmidėje, parodytoje Fig.19. SCF1-193 ekspresijos pCEMI plazmidė yra šios reakcijos produktas.

Plazmidė pCFM I 156 žiurkės SCF1-193 buvo transfekuota į kompetentines FM *E.coli* ląsteles. Plazmidžių selekciją vykdė pagal atsparumą markerinio geno antibiotikui (kanomicinui). Plazmidės buvo atskirtos nuo kultūrinių ląstelių ir sintetinių poligonukleotidų DNR sekas ir jų susijungimą su žiurkės SCF genu patvirtino DNR sutvarkymo būdu.

Plazmidės pCFM I 156 žiurkės SCF¹⁻¹⁶² koduoto (Met⁻¹) žiurkės SCF¹⁻¹⁶² polipeptido fragmento iš EcoRI iki SstII, buvo išskirtas iš V19.8 žiurkės SCF¹⁻¹⁶² ir liguotas į pCEM žiurkės SCF¹⁻¹⁹³ unikaliose padėtyse, tokiu būdu pakeičiant koduojančias sritis žiurkės SCF geno karboksilinėmis liekanomis.

Plazmidės pCFM I156 žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ ir pCEM 1156 SCF¹⁻¹⁶⁵, koduotų (Met⁻¹) žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ ir (Met⁻¹) žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁵ polipeptidų, atitinkamai buvo izoliuoti EcoRI ir SstII fragmentai iš PCR DNR, užkoduojantys 3' galo SCF ir pakeitė DNR koduoto SCF geno karboksilinio galo padėtį. DNR amplifikaciją vykdė su pradmenimis 227-29 ir 237-19 konstruojant pCFM I 156 žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ ir 227-29 ir 237-20, konstruojant pCFM I156 SCF¹⁻¹⁶⁵.

B. Rekombinantinis žiurkės SCF

Šis pavyzdys aprašo ekspresiją *E.coli* ląstelėse žmogaus SCF polipeptido, koduojant DNR (Met⁻¹) žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ ir (Met⁻¹) žmogaus SCF¹⁻¹⁸³ (Fig.15C). Plazmidė su V19.8 žmogaus SCF¹⁻¹⁶², turinti žmogaus SCF¹⁻¹⁶² geną, naudojo kaip matricą PCR žmogaus SCF geno amplifikacijoje.

Oligonukleotidinius pradmenis 227-29 ir 237-19 naudojo PCR DNR generavimui ir veikė endonukleazėmis PstI ir SstI. Aprūpinant Met-iniciavimo kodoną ir atstatant kodonus pirmoms keturioms žmogaus polipeptido SCF aminorūgštims (Glu, Gly, Ile, Cys), buvo paruoštas sintetinis oligonukleotidinis linkeris su NdeI ir PstI galūnėmis

5'TATGGAAGGTATCTGCA 3'

3' ACCTTCCATAG 5'

Nedidelis oligolinkeris, gautas iš žmogaus SCF geno, ligavimo pagalba buvo įstatytas į pCEM 1156 (kaip aprašyta anksčiau) unikaliose vietose NdeI ir PstI plazmidėje, parodytoje Fig.19.

Plazmidė pCEM 1156 žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ transformuota į FM5 *E.coli* kompetentines ląsteles. Ląstelių su plazmidėmis selekciją vykdė pagal atsparumą markerinio geno antibiotikui (kanomicinui). Plazmidės buvo atskirtos nuo kultūrinių ląstelių ir DNR geno sekas patvirtino DNR sutvarkymo būdu.

Plazmidės pCEM 1156 žmogaus SCF¹⁻¹⁸³ koduojančio polipeptido (Met¹) žmogaus polipeptido SCF¹⁻¹⁸³ (Fig.15C), apribojantys fragmentai nuo EcoRI iki HindIII, koduojantys žmogaus SCF geno karboksilinį galą, buvo izoliuotas iš pGEM žmogaus SCF 114-183 (aprašyta žemiau), apribojantis fragmentus nuo SstI iki EcoRI, koduojantis N-galą žmogaus SCF geno ir buvo izoliuotas iš pCEM 1156 žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴, o taip pat buvo izoliuotas didelis fragmentas nuo HindIII iki SstI iš pCEM 1156. Trys DNR fragmentai buvo kartu liguoti sudarant pCEM 1156 žmogaus SCF¹⁻¹⁸³, kuris buvo transformuotas į FMS *E.coli*. Po selekcijos pagal atsparumą kanomicinui, buvo izoliuota plazmidinė DNR ir DNR sekų teisingumas tikrintas sutvarkymu.

Plazmidės pGEM3 žmogaus SCF¹¹⁴⁻¹⁸³ yra pGEM3 darinys, kuris turi EcoRI-SpHI fragmentą, apjungiantį nukleotidus nuo 609 iki 820 sekų, parodyta Fig.15C. EcoRI-SpHI įjungimas buvo izoliuota iš PCR, kurioje naudojo oligonukleotidinius pradmenis 235-31 ir 241-6 (Fig.12C) ir PCR 22.7 (Fig.13B), kaip matricą. 241-6 seka remiasi žmogaus seka nuo 3'-galo aksono, turinčio 176 aminorūgšties kodoną.

C. E.coli fermentacija susidarant žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴

SCF¹⁻¹⁶⁴ gavimui fermentaciją vykdė 16 litrų fermentatoriuose, naudojant FM5 *E.coli* K12, turinčią plazmidę pCFM 1156 žmogaus SCF 1-164. Kultūros kamienus laikė -80°C 17% glicerine Luria terpėje. Pasėjamosios medžiagos gavimui 100 ml atšildyto kamieno pasėjamosios pernešė į 500 ml Luria terpės dviejų litrų Erlenmejerio kolbą ir paliko per naktį 30°C temperatūroje kratytuvuose (250 aps/min).

Norėdami gauti *E.coli* biomasę, naudojamą kaip pradinę medžiagą žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ valymui, naudojo tokias fermentacijos sąlygas.

Kamieninė kultūra aseptiškai buvo pernešta į 16 litrų fermentatorių, kuriame buvo 8 l terpės (žr. 9 lentelę). Kultūrą augino iki optinio tankio $OD_{600}=3.5$. Į fermentatorių peristaltinio siurblio pagalba steriliai supylė pasėjamąją medžiagą (1 užsėjimas, 10 lent.), kontroliuojant užsėjimo greitį. Pasėjamosios augimo greitis buvo eksponentinis ir augimo greitis 0.15 l/val. Augimo fazės metu, temperatūra buvo apie 30°C. Ištirpusio deguonies koncentracija fermentatoriuje buvo kontroliuojama automatiškai, palaikant 50% įsotinimą deguonimi, kontroliuojant oro padavimą, maišymo greitį, slėgį inde ir deguonies padavimą kontrolei. pH 7.0 buvo reguliuojamas automatiškai, naudojant fosforo rūgštį ir amoniaką. Esant $OD_{600} \approx 30$, temperatūra nuo 30°C pakeliama iki 42°C ir tuo įvykdoma indukcija. Tuo pačiu metu nutrauktas 1 užsėjimas ir pradėtas 2 užsėjimas (11 lent.) 200 ml/val greičiu. Praėjus maždaug 6 val. po temperatūros pakėlimo, fermentatoriaus turinį atšaldė iki 15°C. SCF 1-164 išeiga buvo maždaug 30 mg/OD-L. Biomasę centrifugavo Beckman J6-B, 3000xg 1val. Biomasė buvo laikoma -70°C šaldytuve.

SCF 1-164 parinktas metodas analogiškas metodui, aprašytam aukščiau, išskyrus šias modifikacijas:

1. 1 pasėjamoji nepaduodama, kol kultūros OD_{600} nepasiekia 5-6.
2. Pasėjamosios padavimo greitis išauga lėčiau, ir tai duoda mažesnį augimo greitį (maždaug 0.08).
3. Kultūra indukuojama, kai OD_{600} yra 20.
4. 2 pasėjamoji įvedama 300 ml/val greičiu.

Visos kitos operacijos analogiškos aprašytoms aukščiau, įskaitant terpę.

Pagal šį procesą SCF¹⁻¹⁶⁴ išeiga buvo gauta maždaug 35-40 mg/OD-l, esant OD-25.

9 lentelė

Terpės sudėtis:

Mielų ekstraktas	10 g/l
Gliukozė	5 g/l
K_2HPO_4	3.5 g/l
KH_2PO_4	4 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/l
NaCl	0.625 g/l
Putų gesintojas DowF-2000	5 ml/l
Vitaminų tirpalas	2 ml/l
Metallų pėdsakų tirpalas	2 ml/l

Metallų pėdsakų tirpalas: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 27 g/l; $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 2 g/l; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2 g/l; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 2 g/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1.9 g/l; koncentruota HCL, 100 ml/l.

Vitaminų tirpalas: riboflavinas 0.42 g/l; pantoteno rūgštis 5.4 g/l; niacinas 6.0 g/l, piridoksinas 1.4 g/l; biotinas 0.06 g/l; folinė rūgštis 0.04 g/l.

10 lentelė

Terpės sudėtis:

Mielų ekstraktas	50 g/l
Gliukozė	450 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6 g/l
Vitaminų tirpalas	10 ml/l
Metallų pėdsakų tirpalas	10 ml/l

Metallų pėdsakų tirpalas: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 27 g/l; $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 0.2 g/l; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ - 2 g/l; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 2 g/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1.9 g/l; koncentruota HCL, 100 ml/l.

Vitaminų tirpalas: riboflavinas 0.42 g/l; pantoteno rūgštis 5.4 g/l; niacinas 6 g/l, piridoksinas 1.4g/l; biotinas 0.06 g/l; folinė rūgštis 0.04 g/l.

11 lentelė

2 užsėjimo terpės sudėtis:

Triptonas	172 g/l
Mielų ekstraktas	86 g/l
Gliukozė	258 g/l

7 pavyzdysImuniniai bandymai SCF nustatymui

Radioimuninių mėginių procedūras (RIP) naudojo SCF kiekybiniam nustatymui mėginiuose ir vykdė sekančiu būdu.

SCF preparatą iš BRL 3A ląstelių, išvalytą, kaip 1 pavyzdyje, inkubavo kartu su antiserumu 2 val. 37°C. Po 2 val. inkubacijos mėgintuvėlius su pavyzdžiais atšaldė lede, pridėjo ^{125}J -SCF, mėgintuvėlius inkubavo 4°C temp. 20 val. kiekviename mėgintuvėlyje buvo 500 ml inkubacinio mišinio, sudaryto iš 50 ml skiesto antiserumo, -60.000 ort ^{125}J -SCF (3.8×10^7 sp/mg) 5ml trazilolo ir 0-400 ml standartinio SCF su buferiu (fosfatinis užbuferintas fiz.tirpalas, 0.1% veršiuko albumino serumo, 0.05% tritono X-100, 0.025% azido), išlaikydami patovų tūrį. Antiserumu buvo antrojo testo triušio kraujas, imunizuotas 50%-nio švarumo natūraliu SCF iš BRL 3A preparatu. Galutinis antiserumo praskiedimas mėginyje buvo 1:2000.

Surištas su antikūnu ^{125}J -SCF buvo išsodintas pridedant 150 ml Staph A (Calbiochem). Po 1 val. inkubacijos kambario temperatūroje pavyzdžius centrifugavo ir nuosėdas du kartus praplovė 0.75 ml Tris-HCl pH 8.2, kuriame buvo 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.05% Tritono X-100. Praplautas nuosėdas perskaičiavo gama-skaitliuku, nustatydami ^{125}J -SCF surišimo procentą. Paskaičiuoti ryšiai iš mėgintuvėlių be serumo, buvo atskirti iš galutinių reikšmių, siekiant koreguoti nespecifinį išsėdimą. Tipinis RIP parodytas Fig.20. ^{125}J -SCF-ryšio, gauto su nežymėtu standartu, inhibavimo procentas priklauso nuo dozės (Fig.20A), ir kaip parodyta Fig.20B, tiriant imuno-išsodintas nuosėdas SDS-PAGE ir autoradiografija susilygino ^{125}J -SCF-baltymo jungtis (Fig.20B) dalis 1- ^{125}J -SCF, 2,3,4, ir 5-imuno-išsodinti ^{125}J -SCF, sulyginti su 0.2, 100 ir 200 g SCF standarto, atitinkamai. Kaip nustatyta abiem metodais, išsodintų antikūnų sumažėjimas, stebimas RIP mėgintuvėliuose ir imuno-išsodintų ^{125}J -SCF-baltyminės jungties (migracija prie maždaug $M_r = 31.000$) sumažėjimas ir poliklonalinis antiserumas atpažįsta standartinį SCF, išvalytą pagal 1 pvz.

Rekombinantinio SCF, išskirto *E.coli*, nustatymui, COS-1, CHO ląstelėse taip pat naudojo Western procedūras. Iš dalies išvalytas, išreikštas *E.coli*, žiurkės SCF¹⁻¹⁹³ (10 pvz.), išreikštas ląstelėje COS-1 žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ ir SCF¹⁻¹⁹³, taip pat, kaip žmogaus SCF¹⁻¹⁶², (4 ir 9 pvz.), ir išreikštas ląstelėje CHO žiurkės SCF¹⁻¹⁶² (5 pvz.) buvo tirti

SDS-PAGE. Po elektroforezės proteininius ryšius pernešė ant 0.2 mM nitroceliuliozės aparato Bio-Rad Transblot pagalba, esant 60 V per 5 val. Nitroceliuliozinę membraną blokavo 4 val. fosfatiniame buferyje pH 7.6, turinčiam 10% ožio serumo, po to - 14 val. inkubavo kambario temperatūroje kiekvieną triušio preimuninį ar imuninį serumą skiedžiant 1:200 (imunizacija aprašyta aukščiau). Serumo-antikūnų kompleksus stebėjo naudojant su peroksidaze konjuguotus ožio antitriušio IgG reagentus (Vector Laboratories) ir spalvos reagentą 4-chlor-1 naftolį.

Dviejų Western analizės pavyzdžiai pateikti Fig.21 ir Fig.22. Fig.21 sritys Zi 5-200 ml gauti iš ląstelių COS-1 žmogaus EPO (COS-1, transfekuoti su V19,8 EPO); 8 sritis - dažyti molekulinių masių markeriai..

1-4 inkubavo su preimuniniu serumu. Imuninis serumas specifiškai atpažįsta difuzinį ryšį $M_r=30.000$ daltonų su SCF¹⁻¹⁶², gautu iš COS-1 ląstelių, bet ne su žmogaus EPO, gautu iš COS-1 ląstelių.

Fig.22 1 ir 7 sritys dalinai išvalytas žiurkės SCF¹⁻¹⁹³, gautas iš *E.coli*; 2 ir 8 sritys - žiurkės SCF¹⁻¹⁹³, gautas iš COS-1 ląstelių iš kviečių grūdų, išvalytų agliutinin-agarozėje; 4 ir 9 - žiurkės SCF¹⁻¹⁶², gautas iš COS-1 ląstelių iš kviečių grūdų, 5 ir 10 sritys, išvalytų agliutinin-agarozėje; 6 sritis - žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴, gautas iš kviečių šeimos CHO ląstelių, išvalytų agliutinin-agarozėje; ir 6 sritis - dažyti molekulinių masių markeriai.

1-5 ir 6-10 sritys inkubavo atitinkamai triušio preimuniniu ir imuniniu serumu. Gautas iš *E.coli* žiurkės SCF¹⁻¹⁹³ (1 ir 7 sritys) migruoja su $M_r = 24.000$ daltonų, tuo metu, kai žiurkės SCF¹⁻¹⁹³, gautas iš CO-1 ląstelių (2 ir 8 sritys) migruoja su $M_r = 24-36,000$ daltonų. Šis molekulinių masių skirtumas lauktas todėl, kad žinduolių ląstelės, bet ne bakterijos, tinkamos glikozilinimui.

Koduotų žiurkės SCF¹⁻¹⁶² sekų transformacija į COS-1 ląsteles (4 ir 9 sritys) ar CHO ląsteles (5 ir 10 sritys), duoda ekspresiją SCF su mažesne molekuline mase, negu esant transfekcijai su SCF¹⁻¹⁹³ (2 ir 8 sritys).

Žiurkės SCF¹⁻¹⁶² iš COS-1 ląstelių ir CHO ekspresijos produktai-tai ryšių serija, turinti matomą M_r tarp 24-36,000 daltonų. Ekspresuoto SCF heterogeniškumas, matomai, apsprendžiamas angliavandenių variantais, kur polipeptidinis SCF glikozilinasi skirtingais dydžiais.

Apskritai, Western analizė rodo, kad triušių, imunizuotų žinduolių gamtiniu SCF, imuninis serumas priima rekombinantinį SCF, gautą iš *E.coli* ląstelių, COS-1 ir CHO, bet nepriima bet kokių ryšių kontroliniame pavyzdyje, sudarytame iš gautų EPO ląstelių COS-1. Toliau palaikant SCF antiserumo specifiškumą SCF, iš anksto imunizuotas to pačio triušio serumas nereagavo su bet koku žiurkės ar žmogaus SCF ekspresijos produktu.

8 pavyzdys

Rekombinantinio SCF aktyvumas gyvame organizme

A. Žiurkės SCF kaulų čiulpų persodinime

COS-1 ląsteles transfekavo V19.8 SCF1-162 pilnoje eksperimentų eilėje (T175 cm² kolbos vietoje 60 mm lėkštelių), kaip aprašyta 4 pvz. Buvo surinkta maždaug 270 ml paviršinio sluoksnio, kurį chromatografavo kviečių grūdų agliutinin-agarozėje ir S-sefarozeje, kaip aprašyta 1 pvz. Rekombinantinį SCF įvertino kaulų čiulpų transplantacijos modelyje, remiantis w/w^v genetika. Pelės w/w^v turi rūšinį ląstelių defektą, kuris kartu su kitais priveda iki mokrocitų anemijos (didelės raudonos ląstelės) ir įgalina kaulų čiulpų transplantaciją iš normalių gyvūnų neprisireikiant apšvitinti recipientus (Russel et al, Sci. 144, 844-846, 1964). Normalias donorines rūšines ląsteles po transplantacijos perauga defektinės ląstelės.

Pateikiamame pavyzdyje kiekvienoje grupėje buvo po 6 subrendusias peles. Kaulų čiulpus surinko iš normalių pelių-donorų ir transplantavo į w/w^v peles. Gyvūno-recipientų kraujas buvo tiriamas kelis kartus po transplantacijos; Kaulų čiulpų persodinimas atliekamas perkeliant periferinio kraujo iš recipientų donoriniam fenotipui. Konversija iš recipientų donoriniam fenotipui pasireiškia pasekminio raudonų kraujo ląstelių išsibastymo profilio (FASCAM, Becton Dickenson) stebėjimu. Kiekvieno transplantuoto gyvūno profilis buvo lyginamas su kontrolinių gyvūnų donorų ir recipientų profiliais kiekvieną laiko momentą. Palyginimas buvo atliekamas naudojant kompiuterines programas, paremtas Kolmogorovo-Smirnovo statistika bėgančių sistemų histogramų analizei (Young.J.Histochem & Cytochem, 25, 935-941, 1977)). Pritaikant nepriklausomų kokybės indikatorių yra hemoglobininis tipas, nustatomas hemoglobino recipientų kraujyje elektroforezės būdu (Wong et al,

Mol.&Cell.Biol., 9, 798-808, 1989), ir gerai sutinka su Kolmogorovo-Smirnovo statistikos nustatymo savybėmis.

Maždaug 300000 ląstelių transplantavo be SCF apdorojimo (kontrolinė grupė 23 pieš.) iš C56BL/6J donorų w/w^v recipientams. Antra grupė gavo 300000 ląstelių, apdorotų SCF (600 vnt/ml) esant 37°C, 20 min. ir įvestų į organizmą kartu (grupė iki apdorojimo, Fig.23). Vienas SCF vienetas, kaip rasta, duoda pusiau maksimalią stimuliaciją MC/9 biomėginyje. Trečios grupės pelės buvo injekuotos po oda (sub-Q) maždaug 400 vnt. SCF/per dieną, 3 dienos po 30000 donorinių ląstelių transplantacijos (grupė poodinių injekcijų, Fig. 23). Kaip parodyta Fig.23, abiejose apdorotose SCF grupėse, kaulų čiulpai prigyja greičiau, negu neapdorotoje kontrolinėje grupėje. Po 29 dienų po transplantacijos, iš anksto apdorota grupė buvo konvertuota į donorinį tipą.

Šis pavyzdys iliustruoja SCF terapijos naudą, persodinant kaulų čiulpus.

B. Žiurkės SCF aktyvumas gyvoje pelėse

Dėl Sl-lokuso mutacijų, atsiranda nepakankamumas kraujodaros, pigmentinės, sėklidžių ląstelėse. Dėl kraujodaros defekto sumažėja raudonųjų kraujo kūnelių skaičius (Russel & Al Gordon, Regulation of Hematopoiesis, 1 t., 649-675, Appieton-Cent.-Crafts, NY, 1970), neutrofilų (Ruscetti, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 152, 398, 1976)), monocitų (Shibata, J.Imm. 135, 3905, 1985), megakariocitų (Ebbe, Exp.Hemat., 6, 201, 1978), ląstelių-žudikų (Clark, Immunogenetics, 12, 601, 1981) ir mast ląstelių (Hayachi, Dev.Biol, 109, 234, 1985). Broniruotos pelės yra blogi recipientai persodinamų kaulų čiulpų dėl sumažėjusių sugebėjimų palaikyti prigimtines ląsteles (Banneman, ProgHematol, 8, 131, 1973).

SCF koduojantis genas pašalintas broniruotai (S1/S1) pelei.

Broniruotos pelės jautrios SCF aktyvumui *in vivo* modelyje. Skirtingi SCF rekombinantiniai baltymai buvo tiriama pelėse Steel-Dickie (S1/S1) įvairius laiko tarpus. Steel pelių (WCB6F1-S1OS1^d), 6-10 savaičių amžiaus gavo iš Jackson Labs, Bar Harbor, ME. Periferinį kraują stebėjo ląstelių skaitiklyje SYSMEX F-800 (Baxter, Irvine, CA): raudonas ląsteles, hemoglobina ir trombocitus. Baltųjų kraujo kūnelių paskaičiavimui (BKK) naudojo Coulter Channelizer 256 (Coulter Electronics, Marietta GA).Eksperimente, 24 pieš., Steel-Dickie pelės buvo apdorojamos SCF1-164,

gaminamu *E.coli*, išvalytu, kaip 10 pvz., 100 mg/kg/per dieną doze 30 dienų laikotarpyje, po to 30 mg/kg/per dieną doze - 20 dienų. Baltymas buvo fiziologiniame tirpale (Abbotts Lab, N.Chicago), IL+0.1% jaučio serumo. Injecijos darytos po oda kiekvieną dieną. Periferinio kraujo monitoringą atliko per uodegų kraujavimą po 50 ml nurodytu Fig.24 laiku. Kraują rinko 3% EDTA praplautais švirkštais ir supylė į perskalautus EDTA mikrofuginius mėgintuvėlius (Brinkmann, Westburg NY). Buvo stebima žymi apdorotų gyvūnų makrocitinės anemijos korekcija lyginant su kontroliniais gyvūnais. Apdorojimus nutraukus, apdoroti gyvūnai grįžo į pradinę makrocitinės anemijos padėtį.

Eksperimente, parodytame Fig.25 ir Fig.26, Steel-Dickie pelės buvo apdorotos skirtingomis rekombinantinio SCF formomis, kaip aprašyta aukščiau, bet 100 mg/kg/per dieną doze 20 dienų. Dviejų formų *E.coli*-žiurkės SCF, SCF¹⁻¹⁶⁴ ir SCF¹⁻¹⁹³ darinius ruošė kaip nurodyta 10 pvz. Papildomai *E.coli* SCF¹⁻¹⁶⁴ modifikavo pridėdant polietilenglikolio (SCF¹⁻¹⁶⁴ PEG 25), kaip buvo patikrinta 12 pvz. CHO-darinys SCF¹⁻¹⁶⁴ gautas, kaip 5 pvz ir išvalytas, kaip 11 pvz., buvo taip pat patikrintas. Gyvūnų kraujas buvo imamas širdies punktūra, 3% EDTA praplautais švirkštais ir supilamas į EDTA praplautus mėgintuvėlius. Periferinio kraujo, po 20 dienų apdorojimo profiliai parodyti Fig.25 baltoms kraujo ląstelėms (BKK) ir Fig.26 - trombocitams. Skirtingi BKK SCF¹⁻¹⁶⁴ PEG 25 grupei parodyti Fig.27. Fiksuojami absoliutūs neutrofilų, monocitų, limfocitų ir trombocitų padidėjimai. Ypač stiprus efektas stebimas su SCF¹⁻¹⁶⁴ PEG 25.

Buvo taip pat atliktas nepriklausomas limfocitų rinkinių išmatavimas; duomenys pateikti Fig.28. Žmogaus CD4 murininis ekvivalentas, ar T-pagalbinių ląstelių markeris yra L3T4 (Dialinas, J.Immun. 131, 2445, 1983).

Lut-2 yra murininis antigenas citoksinių T-ląstelių (Ledbetter, J.Exp.Med, 153, 1503, 1981). Apdorotų gyvūnų T-ląstelių rinkinių įvertinimui naudojo monokloninius antikūnus prieš šiuos antigenus.

Visą kraują T-limfocitų rinkiniui nudažė sekančiu būdu. 200 µl viso kraujo buvo paimta iš gyvūnų individualiai į EDTA apdorotus mėgintuvėlius. Kiekvieną kraujo pavyzdį lizavo steriliu dejonizuotu vandeniu 60 sek, ir po to padarė izotoniniu naudodami 10xDilbecco fosfatinį buferinį fizioginį tirpalą (FBF) (Gibco, Grand Island, NY). Šį lizuotą kraują praplovė 2 kartus IXDulbecco fosfatinio buferiniu fiziologiniu

tirpalu (Gibco, Grand Island, NY), pateikiamu su 0.1% jaučio serumu (Flow Lab. McLean, Va) ir 0.1% natrio azidu. Ląstelių nuosėdas (turinčias 200000-105 ląsteles) resuspendavo su 20 μ l žiurkės priešpeliniu L 34T, konjuguotu su fikoeritrinu (FE) (Beckton Dickinson, Mountain View), ir 20 μ l žiurkės priešpeliniu Lyt-2, konjuguotu su fluoresceino izotiocianatu, inkubuotu lede (4°C) 30 min. (Beckton Dickinson). Po inkubacijos ląsteles 2 kartus praplovė IX FBR. Kiekvieną kraujo pavyzdį po to analizavo AC sap ląstelių analizės sistemoje (Beckton Dickinson, Mountain View, CA).

Ši sistema buvo standartizuota standartinių prieškompensacinių procedūrų ir kalibracinių granulių pagalba (Beckton Dickinson, Mountain View, CA). Šie duomenys parodė tiek ląstelių T-pagalbininkų, tiek ir citoksinių T-ląstelių absoliutų augimą.

C. SCF aktyvumas gyvuose primatuose

Žmogaus SCF ¹⁻¹⁶⁴, išskirtas iš *E.coli* (6B pvz.), ir suvienodintas, kaip 10 pvz., tyrė *in vivo* biologinį aktyvumą. Babuinų (*Papio sp.*) suaugę patinai buvo suskirstyti į 3 grupes: 1) neapdorotus, n-3; 2) SCF 100 mg/kg/per dieną, n-6; 3) SCF 30 mg/kg/per dieną, n-6.

Apdorojamiems gyvūnams kiekvieną dieną buvo daromos poodinės injekcijos. Pilniems kraujo, retikulocitiniais ir trombocitiniais paskaičiavimams pavyzdžiai imti 1, 6, 11, 15, 20 ir 25 apdorojimo dieną.

Visi gyvūnai iškentė procedūrą ir neturėjo neigiamų reakcijų SCF terapijai. BKK skaičius išaugo pas gyvūnus, gavusius 100 mg/kg.per dieną, kaip parodyta Fig.29. Diferencijuotas skaičiavimas atliktas pagal Wright Giemsa periferinių kraujo dėmių dažymą ir taip pat nurodytas Fig.29. Buvo fiksuotas absoliutus neutrofilų, limfocitų ir monocitų augimas. Paip parodyta Fig.30, buvo taip pat hemtokritų ir trombocitų augimas, esant 100 mg/kg/per dieną dozei.

Žmogaus SCF (hSCF 1-164, modifikuotas polietilenglikolio pridėjimu, kaip 12 pvz.), taip pat buvo tikrintas su babuiniais duodant 200 mg/kg/per dieną dozę, pailgintu intraveniniu įvedimu ir lyginamas su nemodifikuotu baltymu. Gyvūnai SCF gavo nuo 0 iki 28 dienos. Periferinio BKK rezultatai pateikti sekančioje lentelėje. PEG modifikuoti SCF rodė ankstesnį periferinio BKK augimą, negu nemodifikuoti SCF.

Apdorojimas 200 mg/kg/per dieną hSCF 1-164

Gyvūnai	M88320	Gyvūnai	M88129
diena	BC	diena	BC
0	5800	0	6800
+7	107000	7+	7400
+14	12600	+14	209000
+16	22000	+21	18400
+22	31100	+23	24900
+24	28100	+29	13000
+29	9600	+30	23000
+36	6600	+37	12100
+43	5600	+44	10700
		+51	7800

Apdorojimas 200 mg/kg/per dieną PEG-hSCF 1-164

Gyvūnai	M88350	Gyvūnai	M89116
diena	BC	diena	BC
-7	12400	-5	7900
-2	11600	0	7400
+4	24700	+6	16400
+7	20400	+9	17100
+11	24700	+13	18700
+14	32600	+16	19400
+18	33600	+20	27800
+21	626400	+23	20700
+25	16600	+27	20200
+28	26900	+29	18600
+32	9200	+33	7600

9 pavyzdys

Rekombinantinio žmogaus SCF aktyvumas

Žmogaus SCF, atitinkantį amino rūgštis 1-162, gautą PCR reakcijos pagalba, aprašytą ED pvz., ekspresavo COS-1 ląstelėje atitinkamai su aprašytu SCF 4 pavyzdžiu. COS-1 ląstelių skystį bandė žmogaus kaulų čiulpuose, o taip pat mėginiuose ant murininės HPP-SCF ir MC/9. Žmogaus baltymas buvo neaktyvus tiriamajame koncentracijų intervale bet kokioje murino analizėje; tuo tarpu, jis buvo aktyvus tiriant žmogaus kaulų čiulpuose. Analizės kultivavimo sąlygos buvo tokios: sveikų savanorių kaulų čiulpus centrifugavo Fco11-Hypaque gradientu (Pharmacia) ir kultivavo sistemoje iš 2.1% metilceliuliozės, 30% veršiuko serumo, 6×10^{-5} M 2-merkaptoetanolio, 2 mM gliutamino, Iskovo terpėje (GIBCO), 20 vnt/ml EPO ir 1×10^{-5} 2 ląst./ml 14 dienų atmosferoje, kurioje buvo 7% O₂, 10% CO₂ ir 83% N. 12 lentelėje nurodyti kolonijų, generuotų esant rekombinantinio žmogaus ir žiurkės SCF COS-1 nuosėdų skysčiams, numeriai. Nurodytos tos kolonijos, kurių dydis 0.2 mm arba didesnis.

12 lentelė

Kolonijų, kurias paveikė SCF, augimas žmogaus kaulų čiulpuose

Plazmidinė transfekcija	Tiriamo CM tūris (μl)	Kolonijos/100000 ląst.+standart.nukryp.
V 19.8 ()	100	0
	50	0
V19.8 žmogaus SCF 1-162	100	33±7
	50	22±3
V 19.8 žiurkės SCF 1-162	100	13±1
	50	10

Kolonijos, išaugusios per 14 dienų, parodytos Fig.31A. (12-kartų padidinta). Strėlė pažymėta paprasta kolonija. Pagal savo dydį, tokia kolonija primena murino HPP-SCF kolonijas (vidutiniškai 0.5 mm). Dėl EPO buvimo, kai kurio tokios kolonijos hemoglobunizuotos. Išskiriant tokias kolonijas ir jas centrifuguojant ant objektinių stiklelių naudojant Citospiną (Shandon) su po to sekančiu dažymu Baltuoju Gemza, tam tikras ląstelių tipas turėjo nediferencijuotą ląstelę su dideliu santykiu branduolys/citoplazma, kas parodyta Fig.31B. (padidinta 400 kartų). Fig.31B strėlėmis parodyta tokios struktūros: 1 strėlė-citoplazma; 2-branduolys; 3-vakuolė. Nesubren-

dusios ląstelės, kaip klasė, yra didelės ir tokios ląstelės tampa mažesnės, priklausomai nuo subrendimo laipsnio (Digss et al, Morfologija žmogaus kraujo ląstelių, Abbot Labs, 3, 1978). Ankstyvųjų ląstelių branduolys pagal hemopoetinį subrendimą atitinka citoplazmą. Be to, nesubrendusių ląstelių citoplazma nusidažo Baltuoju Gemza giliau, negu branduolys. Pagal ląstelių subrendimą, branduolys įgauna tamsesnę spalvą, negu citoplazma. Žmogaus kaulų čiulpų, gautų iš kultūros dalyvaujant rekombinantiniam SCF, ląstelių morfologija sutinka su išvadomis apie tai, kad taikinyis ir SCF produktas yra santykinai nesubrendęs kraujodaros pirmtakas.

Žmogaus rekombinantinį SCF bandė agarizuotų kolonijų analizėje pagal poveikį kaulų čiulpams kombinacijoje su kitais augimo faktoriais, pagal ankstesnį aprašymą. Gauti rezultatai pateikti 13 lentelėje.

Sinergizmas pasireiškia esant G-SCF, GM-SCF, IL-3 ir EPO, individualiais SCF atvejais padidinant kaulų čiulpų taikinio proliferacijos laipsnį.

13 lentelė

Žmogaus rekombinantinio SCF, esant kitiems faktoriams, stimuliuojantiems žmogaus kolonijas, sinergizmas

Imitacija	Kolonija, 10^5 ląst./per 14 dienų
hG-SCF	32±3
hG-SCF + hSCF	74±1
hGM-SCF	14±2
hCM-C + hSCF	108±5
hIL-3	23±1
hIL-3 + hSCF	108±3
hEPO	10±5
hEPO + iL-3	17±1
hEPO + hSCF	86±10
hSCF	0

Kitas žmogaus rekombinantinio SCF aktyvumas pasireiškia sugebėjimu iššaukti ūmios žmogaus mieologeninės anemijos ląstelių linijos proliferaciją (AMI) KG-1 (ATCC CCI 246) pusiau kietame agare. Nuosėdų skystis COS-1 nuo transfekuotų ląstelių buvo klonuotas ant agaro KG-1 (Koefflor et al, Sci. 200, 1153-1154, 1978) praktiškai pagal

aprašytą metodiką išskyrus tai, kad ląsteles išsėjo 3000/ml kiekiu. 14 lentelėje pateikti kultūrų trijų paralelių bandymų rezultatų vidurkiai.

14 lentelė

Klonavimo bandymas ant pusiau kieto agaro KG-1

Transfekuotos plazmidės	Tiriamasis tūris, μ l	30000 ląstelių kolonija+vidut. nukr.
V19.8	25	2 $\pm$ 1
V19.8 žmogaus SCF1-162	25	14 $\pm$ 0
	12	8 $\pm$ 0
	6	9 $\pm$ 5
	3	6 $\pm$ 4
	1.5	6 $\pm$ 6
V19.8 žiurkės SCF 1-162	25	6 $\pm$ 1
žmogaus GM-SCF	50/5 mg/ml	14 $\pm$ 5

10 pavyzdys

Rekombinantinio SCF ekspresuoto E.coli produktų valymas

E.coli fermentaciją žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ vykdė pagal 6C pavyzdžio metodiką. Biomase (svoris šlapios biomasės 912 g) suspendavo vandenyje iki 4.6 l tūrio ir ardė tris kartus leisdami per laboratorinį homogenizatorių (Gaulin 15MP-8TBA), esant 55158 kPa slėgiui. Centrifuguodami gavo susmulkintų ląstelės granulių frakciją (17700xg, 30 min., 4°C), praplovė vandeniu (resuspendavimas ir recentrifugavimas) ir pagaliau suspendavo vandenyje iki 400 ml.

Po centrifugavimo nuosėdų frakciją, turinčią netirpstantį SCF (įvertintas kiekis SCF 10-12 g) sudėjo į 3950 ml atitinkamo mišinio taip, kad galutinė mišinio komponentų koncentracija buvo 8 M karbamido (ypatingo švarumo), 0.1 mM EDTA, 50 mM natrio acetato, pH 6-7, SCF koncentraciją įvertino kaip 1.5 mg/ml. Siekiant ištirpinti SCF, inkubavo kambario temperatūroje 4 val. Likusią neištirpusią medžiagą pašalino centrifuguodami (17700xg, 30 min., kambario temp.). Pakartojant (parūgštėjimas ištirpusio SCF), nusėdusią frakciją lėtai, maišant supylė į 39.15 l atitinkamo mišinio taip, kad galutinės komponentų koncentracijos buvo: 2.5 M karbamido (ypatingo švarumo,

0.01 mM EDTA, 5 mM natrio acetato, 50 mM Tris-HCL, pH 8.5, 1 mM gliutatio, 0.02% (masė/tūriui) natrio azido. SCF koncentraciją nustatė 150 µg/ml. Po 60 val. kambario temperatūroje (galima laikyti mažiau, pvz. 20 val.), maišant, mišinys buvo du kartus koncentruotas naudojant Millipor Pelicon ultrafiltracijos įrenginį su trimis membranėmis iš polisulfono, molekul. masė 10000, kasetėmis (bendras plotas 1,39 m²) ir po to diafiltravo atitinkamai 7 tūriais 20 mM Tris-HCl, pH8. Temperatūra koncentravimo (ultrafiltracijos) metu buvo 4°C, tekėjimo greitis-5 l/min ir filtracijos greitis 600ml/min. Galutinis tūris buvo 26.5 l. Naudojant SDS-PAGE operaciją, kurią vykdė su pavyzdžiais arba be jų, darosi aišku, kad didesnė dalis (>80%) frakcijos SCF nuosėdų po centrifugavimo ištirpsta inkubuojant su 8 M karbamido ir kad po parūgštėjimo, sistemoje egzistuoja daug SCF formų, ką rodo neatstatyto pavyzdžio SDS-PAGE. Pagrindinė forma, kuri yra kaip teisingai parūgštintas SCF (žr. žemiau), migruoja su M_r maždaug 17000 (neredukuota) santykinai markerių (redukuotų), aprašytų Fig.9 su išnaša, molekulinei masei. Daugelis formų turi medžiagą, migruojančią su M_r 18-20000 (neredukuotas), matomai, turi SCF neteisingais disulfidiniais ryšiais; sudarančiais SCF polipeptidines grandines kovalentiškai surištas su dimerų ar stambių oligomerų susidarymu. Paskutinės frakcionavimo stadijos priveda prie likusių *E.coli* priemaišų ir nepageidaujamų SCF formų pašalinimo ir to rezultate pasiekiamas SCF išvalymas iki homogeniško ir biologiškai aktyvaus būvio.

Ultrafiltruoto retentato pH nustatė lygų 4.5, pridedant 375 ml 10% (tūris/tūriui) acto rūgšties, ir to pasekoje medžiaga išsėdo. Po 60 min., kada didžioji dalis išsėdusios medžiagos nusėdo ant dugno, viršutinius 24 l dekantavo ir filtravo, kad nuskaidrėtų per Sipo 30 SP filtrus 500ml/val greičiu. Po to filtratą skiedė 1.5 karto vandeniu ir 4°C temp. leido per koloną (9x18.5 cm) greita tėkme S-sefarozės (Pharmacia) išlygsvarintą 25 mM natrio acetato, pH 4.5. Kolonėlėje tekėjimo greitis buvo 5 l/val ir temperatūra 4°C. Po pavyzdžio praleidimo, koloną praplovė 5 tūriais (6 l) buferio ir SCF, surišto su kolonos medžiaga eliuavo 0-0.23 M NaCl kolonos buferio eliuentu. Bendras gradiento tūris buvo 20 l ir frakcijas ėmė po 200 ml. Eliuavimo profilis atvaizduotas Fig.33. Frakcijos alikvotos (10 µl) surinktos iš kolonos su S-sefaroze analizavo SDS-PAGE metodu, kurį vykdė kaip su pavyzdžio redukavimu (Fig.32A), taip ir be jo (Fig.32B). Iš tokios analizės

duomenų matyti, kad praktiškai visas sugėrimas buvo 280 nm srityje (Fig.32 ir Fig.33) ir gali būti priskirtas SCF.

Teisingai oksiduota forma pirmiausiai atitinka sugėrimo piką (22-38 frakcija, Fig.33). Formos su nedideliu kiekiu, kurį galima vizualiai stebėti frakcijose, įjungia neteisingai oksiduotą medžiagą su M_r 18-20.000 ant SDS-PAGE (neredukuotas) atstojantį pagrindinio piko sugėrimo petį (10-21 frakcijos, Fig.32B); o disulfidiškai surišta dimerinė medžiaga randasi visame sugėrimo intervale (10-38 frakcijos, Fig.32B).

Frakcijos 22-38 iš kolonos su S-sefaroze nupylė ir pH gauto mišinio nustatė 2.2, pridėdant maždaug 11 ml 6 N HCl ir praleido per C4 Vudac koloną (aukštis 8.4 cm, diametras 9 sm) nulygsvarintą 50% etanolio (tūris/tūriui), 12.5 mM HCl tirpalu (A) prie 4°C. Dervą kolonai paruošė sausą, dervą suspenduodami 80% etanolio (tūris/tūriui), 12.5 mM HCl (tirpalas B) ir išlygsvarino tirpalu (A). Prieš gaunant pavyzdžius naudojo tuščią gradientą nuo tirpalo A iki tirpalo B (bedras tūris 6 l) ir po to koloną vėl išlygsvarino tirpalu A. Gavus pavyzdžius, koloną plovė 2.5 l A tirpalu ir SCF medžiagą surištą su kolonos medžiaga eliuavo tirpalų A-B gradientu (bendras tūris 18 l), greitis 2670 ml/val. Buvo paimtos 286 frakcijos po 50 ml ir alikvotos analizuotos pagal sugėrimą ties 280 nm (Fig.35), o taip pat SDS-PAGE metodu (25 μ l iš frakcijos) atitinkamai aukščiau esančio aprašymo (Fig.34A, redukuojančios sąlygos; Fig.34B neredukuojančios sąlygos). 62-161 frakcijos, turinčios teisingai oksiduotas SCF gerai išvalytame būvyje nupylė, (santykinai didelius kiekius neteisingai oksiduoto monomero su M_r 18-20000 (neredukuotas) vėliau eliuavo gradiento terpėje (166-211 frakcijos), disulfidiškai surištą dimerinę medžiagą eliuavo taip pat vėliau (maždaug 199-235 frakcijos) (Fig.35).

Etanolio pašalinimui iš gauto 62-161 frakcijų mišinio ir SCF koncentravimui naudojo metodiką, naudojant jonų-mainų dervą su greitu O-sefarozės tekėjimu (Pharmacia). Mišinį (5 l) skiedė vandeniui iki 15.625 l tūrio, etanolio koncentraciją sudarydami maždaug 20% (tūris/tūriui). Po to siekiant nustatyti pH-8, pridėjo 1 M Tris-bazės (135 ml) ir papildomai 1 M Tris-HCl: pH 8, (23.6 ml) nustatydami bendrą koncentraciją Tris 10 mM. Po to pridėjo 10 mM Tris-HCl, pH 8 (15.5 l) privedant iki bendro sistemos tūrio 31.26 l ir etanolio koncentraciją iki 10% (tūris/tūriui). Po to medžiagą leido per O-sefarozės koloną 4°C greita tėkme (aukštis 6.5 cm, diametras 7 cm) nulygsvarintą 10

mM Tris-HCl, pH 8, po to koloną praplovė 2.5 l kolonos buferiu. Tekėjimo greitis imant pavyzdžius ir praplaunant buvo 5.5 l/val. Siekiant eliuuoti su SCF surištą medžiagą, per koloną priešinga kryptimi leido 200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 200 ml/val. greičiu. Frakcijas ėmė po 12 ml ir jas analizavo 280 nm sugėrimo bangoje ir taip pat SDS-PAGE metodu, aprašytu aukščiau. 16-28 frakcijas nupylė (157 ml).

Po to mišinį turintį SCF analizavo dviem atskiromis chromatografijomis (po 78.5 ml kiekviename bandyme) ant gel-filtracinės kolonos (5x138 cm) su Sefakrilu S-200 HP (Pharmacia); nulygsvarinus fosfatinu buferiu 4°C temperatūroje. Frakcijas ėmė po 15 ml esant 75 ml/val tekėjimo greičiui. Kiekvienu atveju, pagrindinį piką, esant sugėrimo bangos ilgiui 280 nm, eliuavo atitinkamais tūriais 1370-1835 ml. Frakcijas iš dviejų nurodytų kolonų, duodančias pikus, apjungė į vieną mišinį 525 ml tūrio, turintį maždaug 2.3 g SCF. Šią medžiagą steriliai filtravo naudojant Millipor Milipak membranas.

Iš kitos pusės, medžiaga iš kolonos C4 gali būti koncentruota ultrafiltracija ir prieš sterilią filtraciją veikiama buferiniais mainais.

Išskirta rekombinantinė žmogaus SCF ¹⁻¹⁶⁴ medžiaga turi didelę švarumo klasę (>98% pagal SDS-PAGE analizę dažant sidabru) ir laikoma, kad toks švarumas atitinka farmakologinius reikalavimus. Naudojant metodus, aprašytus 2 pvz., buvo nustatyta, kad gauta medžiaga turi aminorūgščių seką atitinkančią gautą SCF genų analize ir turi N-galo amino rūgščių seką Met-Glu-Gly-Ile..., kaip ir buvo laukta atitinkamai su Met koduojančiu iniciatyviniu kodonu.

Pagal metodus lyginamus su aprašytais žmogaus SCF ¹⁻¹⁶⁴ ekspresuoto *E.coli*, gali būti išskirtas SCF ¹⁻¹⁶⁴ (taip pat esant netirpios formos ląstelės viduje) išvalytoje būklėje aukšto laipsnio biologiniu aktyvumu. Analogišku būdu gali būti išskirtas žmogaus SCF ¹⁻¹⁸³ ir žiurkės SCF ¹⁻¹⁹³. Žiurkės SCF ¹⁻¹⁹³ susidarymo eigoje (oksidavimas turi tendenciją sudaryti įvairius oksiduotus darinius) gali apsunkinti pašalinimą chromatografijos eigoje. Žiurkės SCF ¹⁻¹⁹³ ir žmogaus SCF ¹⁻¹⁸³ gali būti proteolitiškai degraduoti ankstyvose išskyrimo stadijose. Pirminė proteolizės vieta yra tarp 160 ir 170 liekanų. Proteolizė gali būti minimizuota reguliuojant sąlygas pvz., SCF koncentracija, pH pakeitimu, 2-5 mM EDTA įvedimu į sistemą ar kitų proteazių (inhibitorijų) įvedimu, o taip pat degraduotų formų tokiu kiekiu, koku egzistuoja sistemoje, pašalinamu atitinkamose frakcionavimo stadijose.

Nors nurodoma, kad karbamido naudojimas stabilizuojant yra pirmaeilis, taip pat sėkmingai galima naudoti kitus stabilizacijos agentus, tokius kaip guanidino hidrochloridą (pvz., 6 M ir 0.25 M), o taip pat N-lauroil-sarkoziną. Pašalinant agentus po pakeitimo/parūgštinimo, išvalytas SCF, pagal SDS-PAGE analizę, gali būti regeneruotas naudojant atitinkamas frakcionavimo stadijas.

Be to, nors geriau dubliavimo/oksidinimo metu naudoti 1 mM konc. gliutationą lygiu ar artimu efektyvumu, gali būti naudojamos ir kitos sąlygos. Pavyzdžiui, naudojant vietoje 1 mM gliutationo, 2 mM gliutationo ir 0.2 mM oksiduoto gliutationo, ar 4 mM gliutaniono ir 0.4 mM oksiduoto gliutationo, ar 1 mM 2-merkaptoetanolio ar kitus tiolinius reagentus.

Be aprašytų chromatografijos metodikų, kurios gali būti naudojamos SCF aktyvios formos išskyrimui, gali būti naudojamos hidrofobinė chromatografija (pvz., naudojant fenil-Sefarozę (Pharmacia) su pavyzdžio neutralia pH reikšme, esant 1.7 M amonio sulfatui ir gradientinė eliuacija, mažinant amonio sulfato kiekį); chromatografija su imobilizuojančiais metalais (pvz., naudojant chelatinę Sefarozę (Pharmacia), pakrautą Cu^{2+} jonais, pavyzdžio pH esant artimam neutraliam naudojant 1 mM imidazolo) ir hidroksilapatitinę chromatografiją (naudojant neutralaus pH pavyzdį su 1 mM fosfato ir eliavimą gradientu, padidinančiu fosfato kiekį); o taip pat kitos šios srities specialistams žinomos metodikos.

Kitos žmogaus SCF formos, visiškai ar dalinai atitinkančios atvirą koduotų aminorūgščių 1-248 seką ar atitinkančios atviro skaitymo rėmelį (Fig.44) taip pat gali būti ekspresuotos *E.coli* ir išskirtos švarioje formoje pagal metodiką, analogišką čia aprašytai, o taip pat kitus šios srities specialistų žinomus metodus.

Formų turinčių taip vadinamą transmembraninę dalį, kurią rodo 16 pavyzdys, valymas ir formavimas, apima detergentų utilizavimą, įtraukiant nejoninius detergentus, o taip pat lipidus, įtraukiant fosfolipidus turinčias liposomines struktūras.

11 pavyzdys

Rekombinantinis SCF iš žinduolių ląstelių

A. CHO ląstelių, produkujančių SCF, fermentacija

Rekombinantinius kiniško žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelių, CHO pDSPa2hSCF1-162 kamienus augino ant mikronešiklių perfuzinėje kultivavimo sistemoje, siekiant gauti produkto žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴. Fermentatoriaus sistema analogiška BRI 3A ląstelių auginimo iš 1B pavyzdžio, išskyrus: CHO ląstelėms naudojama kultivavimo terpė buvo modifikuotos Dulbeko (DMEM) ir mitybinės Chamso 12 terpės mišinys, santykiu 1:1 (GIBCO), kurią papildė 2 mM gliutamino, nebūtinomis aminorūgštimis (tam, kad padvigubintų esamą koncentraciją, praskiedus 1:100 Gibco terpę) ir 5% veršiuko serumu. Galutinė terpė buvo identiška, išskyrus serumą. Reaktorių užsėjo 5.6×10^9 CHO ląstelėmis, išaugintomis 3 l kolbose. Ląsteles augino iki koncentracijos 4×10^5 ląst/ml. Po to įpylė 100 g iš anksto išsterilinto citodeks-2 mikronešiklio (Pharmacia) 3 l fosfatinio buferio. Ląstelėms leido susiristi ir augino ant šių mikronešiklių 4 dienas. Kultivavimo terpę perfuzuodavo per reaktorių pagal gliukozės išnaudojimą. Gliukozės koncentracija buvo palaikoma maždaug 2.0 g/l. Po 4 dienų, fermentatorių perfuzavo šešiais terpės, neturinčios serumo, tūriais, kad baltymo koncentracija būtų <50 mg/ml.

Po to reaktorių dirbo periodiniu režimu, kol gliukozės koncentracija nesumažėjo iki 2 g/l. Po šito, reaktorių dirbo pastovaus perfuzijos greičio režimu, lygiu 20 l/dieną. Kultūrinės terpės pH buvo 6.9 ± 0.3 , palaikomas reguliuojant CO₂ tekėjimo greitį. Ištirpusio deguonies kiekis buvo palaikomas aukščiau 20% įsotinimo oru, esant būtinumui, paduodant gryną deguonį.

Temperatūra palaikoma $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Anksčiau aprašytoje sistemoje gavo maždaug 450 l neturinčios serumo kondicinės terpės ir ją naudojo kaip išeiginę medžiagą rekombinantinio žmogaus SCF¹⁻¹⁶² valymui.

Analogiškai vykdytoje sistemoje, naudojant CHO pDSPa2hSCF1-162, gavo maždaug 589 l neturinčios serumo kondicinės terpės ir ją naudojo kaip žaliavą gauti žiurkės SCF¹⁻¹⁶².

B. Rekombinantinio ekspresuoto žiurkės SCF 1-162, valymas

Jeigu atskirai nepažymėta, tai visos valymo operacijos atliekamos 4°C .

1. Koncentravimas ir diafiltracija

Kondicinę terpę be serumo, gautą auginus ląstelių pDSRa2 žiurkės SCF¹⁻¹⁶² kamieną, pagal A skyriuje aprašytą metodiką, filtravo per 0.45 µm Sartokapsules

(Sartorius). Keletą skirtingų partijų (36 l, 101 l, 102 l, 200 l, 150 l) atskirai koncentravo ir veikė diafiltraciniais/buferiniais mainais. Iliustracijai aprašyta operacija su 36 l. Nufiltruotą kondicinę terpę koncentravo iki 500 ml naudojant tangentinį ultrafiltracijos aparatą Millipor Pelikon su trimis membranų iš acetatceliuliozės, molekul. masė 10000 (bendras membranų plotas 1,39 m², tekėjimo greitis 220ml/min), kasetėmis. Po to vykdė diafiltraciją/buferinius mainus anijonų mainų chromatografijos preparate, pridėdant 2000 ml 10 mM Tris-HCl, pH 6.7-6.8 iki 500 ml tūrio į antrinio koncentravimo koncentratą, naudojant ultrafiltracijos aparatą su tangentine srove ir 5 kartus pakartojant operaciją. Koncentruotas/diafiltruotas preparatas galutinai buvo 1000 ml. Visų kondicinės terpės partijų koncentravimas ir diafiltracija buvo vienodas. Baltymo kiekis partijose nustatytas Bredfordo metodu (Anal.Bioch. 72, 248-253, 1976), naudojant kaip standartą veršiuko albuminą, ir sudarė 70-90 µg/ml. Bendras kondicinės terpės kiekis buvo 589 l.

2. Anijonų-mainų greitos tėkmės chromatografija su Q-Sefaroze

Koncentruoti/diafiltruoti preparatai iš visų penkių kondicinės terpės partijų buvo apjungti (bendras tūris 5000ml). pH nustatė 6.75, pridėdant 1 M HCl, 2000 ml 10 mM Tris-HCl, pH 6.7, pralaidumas 0.700 mm o.

Preparatą leido per anijonų-mainų koloną su Q-Sefaroze greita tėkme (36x14 cm; Sefarozė greitos tėkmės, Pharmacia), nulygsvarinant 10 mM Tris-HCl buferiu, pH 6.7. Po pavyzdžio praleidimo, koloną praplovė 28.700 ml Tris buferiu. Po to koloną plovė 23.000 ml mišiniu iš 5 mM acto rūgšties (1 mM glicino/6 M šlapalo), 20 µM CuSO₄ esant pH 4.5. Po to plovė 10 mM Tris-HCl, 20 mM CuSO₄, esant buferio pH 6.7, siekiant pH priartinti prie neutralaus ir pašalinti karbamidą ir po to naudojo druskų gradientą (0-700 mM NaCl/10 mM Tris-HCl, 20 mM CuSO₄, buferio pH 6.7; bendras tūris 40 l). Frakcijas ėmė po 490 ml, esant tekėjimo greičiui 3.250 ml/val. Gauta chromatograma parodyta Fig.36. "MC/9 imp./min." atspindi biologinį aktyvumą, tiriant MC/9; aukščiau nurodytas frakcijas analizavo po 5 µl. Pieš. neparodyti surinkti pavyzdžių eigoje eliuantai, o taip pat plovimo tirpalai; kurie šiose frakcijose neturėjo biologinio aktyvumo.

3. Chromatografija, naudojant dervas angliavandenių, surištų su silicio oksidu, pagrindu.

Fig.36 parodyto bandymo 44-46 frakcijas apjungė (11.200 ml) ir pridėjo EDTA iki galutinės koncentracijos 1 mM. Medžiaga 200 ml/val greičiu užnešta ant kolonos C4 (Vidak baltymai C4; 7x8 cm) nulygsvarintos buferiu (A) 10 mM tris pH 6.7 (20% etanolio). Užnešus pavyzdį, koloną plovė 1000 ml A buferiu. Po to naudojo linijinį gradientą nuo buferio A iki buferio B (10 mM tris su pH 6.7/94% etanolio) (bendras tūris 6000 ml) ir frakcijas ėmė po 30-50 ml. Iš kolonos C4 išseiginės medžiagos porcijos, nupylus medžiagas gautas bandyme ir praplovimo tirpalus, o taip pat gradiento frakcijos 0.5 ml alikvotas atitinkamai dializavo fosfatiniu buferiu. Tokias skirtingas frakcijas tyrė MC/9 analize, 5 µl alikvotas, gautas frakcijų gradientė; imp./min. Fig.37.

SDS-PAGE duomenys (Lazmli, Nature, 227, 680-685, 1970); skirtingų frakcijų alikvotų koncentruojantys geliai su 4% (masė/tūriui) akrilamido ir skiriamieji geliai su 12.5% (sv./tūriui/akrilamido) parodyti Fig.38. Gelių pavyzdžių alikvotas (100 µl) džiovino vakuume ir po to pakartotinai ištirpino naudodami 20 µl apdorojančio buferio (redukavimas pvz., su 2-merkaptoetanolio) ir virė 5 min. prieš užnešant ant gelio. Pieš. kairiame kampe skaičiais pažymėtos markerių molekul. masės (redukuoti), kaip ir Fig.6. Skaičių eilutės rodo atitinkamas frakcijas, surinktas paskutinėje gradiento dalyje. Geliai buvo dažyti sidabru (Morisei, Anal.Bioch., 117, 307-310, 1981).

4. Anijonų-mainų greitos tėkmės chromatografija su Q-Sefaroze.

Iš kolonos C4, parodytos Fig.36, 98-124 frakcijas nupylė (1050 ml), ir praskiedė 1:1 santykiu 10 mM Tris-buferiu pH 6.7, sumažinant etanolio koncentraciją. Po to tirpalą užnešė ant anijonų mainų greitos tėkmės kolonos su Q-sefaroze (3.2x3cm, Q-sefarozė greitos tėkmės, Pharmacia), išlygsvarino 10 mM Tris-HCl buferiu, pH 6.7. greitis 463 ml/val. Po pavyzdžio, koloną praplovė 135 ml kolonos buferio ir surištą medžiagą eliuavo plaunant 10 mM tris-HCl, 350 mM NaCl, pH 6.7. Tekėjimą priešinga kryptimi kolonoje keitė tam, kad minimizuoti eliuanto kiekį ir eliuavimo eigoje ėmė frakcijas po 7.8 ml.

5. Gel-filtracinė chromatografija naudojant Sefakrilą S-200 HP

Frakcijas su eliuotu baltymu, gautas iš druskų praplovimo stadijos po anijonų mainų greitos tėkmės kolonos su Q-Sefaroze, apjungė (31 ml). 30 ml tokio mišinio užnešė ant gel-filtracijos kolonos su Sefakrilu S-200 (Pharmacia), (5x55.5 cm) išlyg-svarintą fosfatinu buferiu. Frakcijos po 6.8 ml buvo renkamos 68 ml/val greičiu. Frakcijas, atitinkančias 280 nm sugėrimo piką, apjungė kaip galutinį išvalytą produktą.

15 lentelėje susumuoti valymo rezultatai.

15 lentelė

Ekspresuoto žinduoliuose žiurkės SCF valymo rezultatai

Stadija	Tūris (ml)	Bendras baltymo kiekis (mg)*
Kondicinė terpė (konc.)	7.000	28.420
Q-Sefarozė greitos tėkmės	11.200	974
C4 derva	1.050	19
Q-Sefarozė greitos tėkmės	31	20
Sefakrilas S-200 H	82	19**

*Nustatyta Bredfordo metodu (žr. aukščiau, 1976)

*Nustatyta kaip dydis 47.3 mg, naudojant kiekybinę amino rūgščių analizę, analogiškai 2 pvz. aprašytam metodui.

Išvalyto žiurkės SCF¹⁻¹⁶² N-galo aminorūgščių seka yra maždaug pusė Gly-Glu-Ile.... ir pusė piroGlu-Gln-ILE... atitinkamai 2 pavyzdžio nustatymo būdui. Gautas rezultatas rodo, kad žiurkės SCF¹⁻¹⁶² yra proteolitinio apdorojimo produktas (skaldymo liekanos pažymėtos (-1) (Thr) ir (+1) (Gln) Fig.14C). Analogiškai išvalytas iš kondicinės terpės transfekuotų CHO ląstelių žmogaus SCF¹⁻¹⁶² (žr. žemiau) turėjo N-galo aminorūgščių seką Gln-Glu-Ile, kaip apdorojimo produktą (skaldymas tarp liekanų žymimas skaičiais(-1) (Thr) ir (+1) (Gln) Fig.15C).

Naudojant aukščiau aprašytas sekų operacijas, gauna išvalytą CHO ekspresuotų ląstelių arba natūralios kilmės žmogaus rekombinantinės formos SCF baltymą.

Papildomi valymo būdai, naudojami žinduolių ląstelių rekombinantinio SCF darinių valyme apima ir tuos būdus, kurie nurodyti 1 ir 10 pvz., o taip pat kitus žinomus šios srities specialistams metodus.

Kitos žmogaus SCF formos, pilnai ar dalinai atitinkančios atviro skaitymo rėmelio koduotas aminorūgštis 1-248, parodytas 42 pieš., arba užkoduotas kita atviro skaitymo rėmelio kRNR (pvz., tomis, kurios pavaizduotos kDNR sekoje, Fig.44) taip pat gali būti ekspresuotos žinduolių ląstelėse ir išskirtos valymo metodais, analogiškais šiam pavyzdžiui, o taip pat kitais specialistų žinomais metodais.

C. SDS-PAGE ir glikozidimas

SDS PAGE apjungtų frakcijų iš gel-filtracinės kolonos su Sefakrilu S-200 HP duomenys parodyti Fig.39; tokius pavyzdžius užnešė po 2.5 µl (1 eilė). Dažė sidabru. Molekulinės masės markeriai (6 pozicija) buvo tokie patys, kaip nurodyta Fig.6. Medžiaga, migruojanti truputį aukščiau ir žemiau markerio M_r 31000 yra biologiškai aktyvi medžiaga; o atsiradęs heterogeniškumas susijęs su glikozilimo heterogeniškumu.

Siekiant charakterizuoti, išvalytą glikoziliniu medžiagą apdorojo dideliu kiekiu glikozidazių, analizavo SDS-PAGE metodu (redukuojančiomis sąlygomis) ir įvertino vizualiai po dažymo sidabru. Gauti rezultatai pateikti Fig.39. Pozicija 2-neuraminidazė, pozicija 3- neuraminidazė ir O-glikanazė, 4-neuraminidazė, N-glikanazė ir N-glikanazė, 5-neuraminidazė ir N-glikanazė, 7- N-glikanazė, 8-N-glikanazė be substrato, 9- N-glikanazė be substrato. Sąlygos buvo vykdomos sistemoje, kur buvo 10 mM 3-(chola-midopropil(dimetilamonio)-1-propano sulfonato) (CHAP), 66.6 mM 2-merkaptetanolio 0.04% (masė/tūriui) natrio azido fosfatinis buferinis tirpalas, 30 min. esant 37°C inkubacijai, ir esant koncentracijoms per pusę mažesnėms nurodytoms ir esant glikozidazei 18 val.-37°C. Neuraminidazę (iš *Arthrobacter vreadfaciens*, teikiama Callbiochem) naudojo 0.5 vnt/ml galutinės koncentracijos. N-glikanazę (Genzim, endo-alfa-acetil-galaktozaminidazė) naudojo 7.5 milivnt/ml kiekį. N-glikanazę (Genzim, peptidas: N-glikozidazė F; peptidas-N⁴/N-acetilbeta-gliukozaminil(asparin amidazė) naudojo 10 vnt/ml kiekį.

Esant būtinumui, darė kontrolines inkubacijas. Tokios operacijos yra: inkubacija be glikozidazių, siekiant patvirtinti tą, kad gauti rezultatai susiję su glikozidazinių preparatų įdėjimu; inkubacija esant glikozilintiems baltymams (pvz., glikozilinto rekombinantinio žmogaus eritropoetino), kurie kaip žinoma, yra glikozidazių substratai, siekiant patvirtinti naudojamų glikozidazinių fermentų aktyvumus; ir inkubacija su glikodazėmis, bet nesant substratui, siekiant gauti informaciją apie teigiamą ar neigiamą glikozidazinių preparatų rolę, vizualiai stebint juostas gelyje (Fig.39, 8 ir 9 pozicijos).

Iš aprašytų eksperimentų galima padaryti eilę išvadų. Skirtingi apdorojimai N-glikanaze (kurie pašalina tiek kompleksinius, tiek didelius manozinius N-surištus angliavandenius (Tarentino et al, BioChem, 24, 4665-4671, 1988), neutraminidazėmis (kurios pašalina sialo rūgšties likučius) ir O-glikanazės (kurios pašalina kai kuriuos O-surištus angliavandenius) (Lambin et al, Biochem. Soc.Trans., 12, 599-600, 1984), leidžia daryti išvadas, kad: sistemoje egzistuoja tiek N-surišti, tiek O-surišti angliavandeniai; ir kad yra sialo rūgštis, ir kai kuriais atvejais jos kažkoks kiekis sudaro O-surištus fragmentus. Faktas, kad apdorojimas N-glikanaze sugeba, pagal SDS-PAGE, paversti heterogeninę medžiagą į greitai migruojančią formą, kuri yra homogeniškesnė, rodo tai, kad visa medžiaga yra vienas ir tas pats peptidas ir heterogeniškumą iššaukia heterogeniškumas glikozilinimo metu.

12 pavyzdys

Rekombinantinio SCF¹⁻¹⁶⁴ PEC gavimas

Žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴, gautą ekspresavimo sistema pagal pavyzdžių GA ir 10 metodikas iš rekombinantinio *E.coli*, naudojo kaip žaliavą polietilenglikolio modifikacijai, aprašytai žemiau.

Metoksipolietileno glikolio-sukcinimidilsukcinatą (18.1 mg=3.63 molio; SS-MPEG=Sigma, No M3152, molek. masės =5000) pridėjo į 0.327 ml dejonizuoto vandens ir pridėjo 13.3 mg (0.727 molio) rekombinantinio žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴, 1ml 138 mM natrio fosfato, 62 mM NaCl, 0.62 mM natrio acetato, pH 8.0.

Gautą tirpalą atsargiai purtė (100 aps/min) kambario temperatūroje 30 min. Po to galutinio reakcijos mišinio 1 ml alikvotą (10 mg baltymo) leido per gel-filtracinę koloną su Superdeksu 75, Pharmacia (1.6x50 cm) ir eliuavo 100 mM natrio fosfato buferiu, pH

6.9, 0.25 m/min greičiu kambario temperatūroje. 10 ml eliuanto atmetė ir po to ėmė frakcijas po 1.0 ml. Nepertraukiamai registravo eliuanto UV sugėrimą (280 nm) ir gautą spektrą pateikė Fig.40A. Frakcijas 25-27 apjungė ir sterilino ultrafiltracija per 0.2 μ m polisulfoninę membraną (Gelman Sci., No 4454) ir gautą tirpalą pažymėjo indeksu PEC-25. Analogiškai apjungė 28-32 frakcijas, sterilizavo ultrafiltracija ir pažymėjo indeksu PEC-32. Apjungta frakcija PEC-25 turėjo 3.06 mg baltymo, o frakcija PEC-32 turėjo 3.55 mg baltymo iš paskaičiavimų, naudojant A_{280} (sugėrimo ties 280 nm) kalibruotę išmatavus 0.66/1mg/ml nemodifikuoto žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ tirpalo. Nereagavęs žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴, turintis 11.8% viso rekombinantinio mišinio baltymo, eliuavosi 34-37 frakcijose. Analogiškais chromatografinio skyrimo sąlygomis nemodifikuotą žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ eliuavo kaip pagrindinį piką, 45.6 ml tūriu (Fig.40B). 77-80 frakcijos (Fig.40A) turėjo N-hidroksisukcinimidą, pašalinį SCF¹⁻¹⁶⁴ reakcijos su SS-MPEC produktą.

Potencialios reakcijai žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ amino grupės turi lizino liekanas ir alfa amino grupę N-galo gliutamininėje liekanoje. PEG-25 apjungta frakcija turėjo 9.3 molio reakcingų amino grupių moliui baltymo, kaip buvo nustatyta spektrofotometriškai titruojant trinitrobenzensulfonidais (TNBS) naudojant Chabibo aprašytą metodą (Anal.Biochem., 14:328-336, 1966). Analogišku būdu, apjungta frakcija PEG-32 turėjo 10.4 molio, o nemodifikuotas žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ atitinkamai turėjo 13.7 molio reakcinių amino grupių/moliui baltymo. Tokiu būdu, vidutiniškai 3.3 (13.7 minus 10.4) žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ amino grupių sujungtoje frakcijoje PEG-32 modifikuojasi pagal reakciją su SS-MPEC. Analogiškai, vidutiniškai 4.4 žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ aminogrupių maišytoje frakcijoje PEG-25 tinka modifikavimui. Žmogaus CF/nSCF¹⁻¹⁶⁴ gautas pagal 10 pvz. metodiką taip pat buvo modifikuotas naudojant aukščiau nurodytas metodikas. 714 mg (38.5 molio) SCF¹⁻¹⁶⁴ reagavo su 962.5 mg (192.5 molio) SS-MPEG 75 ml 0.1 M natrio fosfatinio buferio. pH 8.0 kambario temperatūroje 30 min. Reakcijos mišinį leido per koloną su Sefakrilu S-200 HR (5x134 cm) ir eliuavo naudojant PB (fosfatinis buferinis tirpalas Gibco Dulbecco be CaCl₂ ir MgCl₂), 102 ml/val greičiu ir frakcijas ėmė po 14.3 ml. Analoginio mišinio 39-53 frakcijas PEG-25, aprašyto aukščiau ir parodyto Fig.40A, apjungė ir nustatė, kad jos turi 354 mg baltymo. Tokio modifikuoto SCF duomenys *in vivo* primatuose pateikti 8C pavyzdyje.

13 pavyzdys

SCF receptorinė ekspresija leukemijos blastuose

Leukeminius blastus surinko iš paciento su leukemija maišytos sekos periferinio kraujo. Ląsteles centrifugavo veikiant tankio gradientu ir veikė adheziškai. Žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ žymėjo jodu pagal aprašytą 7 pavyzdyje metodiką. Ląsteles inkubavo skirtingų koncentracijų SCF pagal aprašytą Brodi, Blood, 75, 1622-1626, 1990. Receptorių susirišimo rezultatai pateikti Fig.41. Receptoriaus paskaičiuotas tankumas buvo maždaug 70000 receptorių ląstelei.

14 pavyzdys

Žiurkės SCF aktyvumas ankstyvuose limfoidiniuose pirmtakuose

Rekombinantinio žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ (rrSCF1-164) aktyvumas sinergetiniam veikimui su 11-7 siekiant sustiprinti limfoidinių ląstelių proliferaciją, buvo tiriamas pelių kaulų čiulpų agarizuotose kultūrose. Šioje analizėje kolonijos suformuotos tikrai rrSCF¹⁻¹⁶⁴ pagalba ir turėjo monocitus, neutrofilus ir blastines ląsteles tuomet, kai kolonijos buvo stimuliuotos tik su 11-7 ar kombinacijoje su rrSCF¹⁻¹⁶⁴ ir turėjo geriausiu atveju pre-B ląsteles. Pre-B ląstelės charakterizuojamos kaip B220⁺, slg⁻, cμ⁺ ir buvo identifikuotos apjungtų ląstelių FACS analize, naudojant fluorescuojančius žymėtus antikūnus antigenams B220 (Kofman, Immunol.Rev., 69, 5, 1982) ir paviršiaus Ig (ožio ITC anti-K, Pietų biotechnologinė asociacija, Birmenhem, AI); o taip pat citonugarinių skaidrių analizę citoplazminei μ ekspresijai, naudojant fluorescuojančius žymėtus antikūnus (ožio TRITC anti-μ, Pietų biotechnologinė asociacija). Rekombinantinį žmogaus 11-7 (rh11-7) gavo iš Tarptautinio biošaltinio (Westlike vill, JA). Pridedant rrSCF1-164, kombinacijoje su ląstelių pirmtako B augimo faktoriumi, buvo pastebėtas kolonijų susidarymo greičio sinergetinis padidėjimas (16 lentelė), kas rodo stimuliuojantį rrSCF¹⁻¹⁶⁴ veikimą ankstyvosioms B ląstelėms.

16 lentelė

Pre-B ląstelių kolonijų susidarymas, stimuliuojant rrSCF1-164 kombinacijoje su ch11-7 veikimu

Augimo faktoriai	Kolonijų skaičius ¹
------------------	--------------------------------

Fiziologinis tirpalas		0	
CF1-164	200 ng	13±2	
	100 ng	7±4	
	50 ng	4±2	
rh11-7	200 ng	21±6	
	100 ng	18±6	
	50 ng	13±6	
	25 ng	4±2	
rh11-7	200 ng +rrSCF1-164	200 ng	60±0
	100 ng+	200 ng	48±8
	50 ng+	200 ng	24±10
	25 ng+	200 ng	21±2

1-kolonijų skaičius, skaičiuojant 5×10^4 pelių kaulų čiulpų ląstelėms.

Kiekvienas dydis yra trijų paralelių bandymų vidutinė reikšmė $\pm$ vidutinis kvadratinis nukrypimas.

15 pavyzdys

Receptoriaus identifikavimas ant SCF

A. c-kit yra receptorius ant SCF¹⁻¹⁶⁴

Atsakant į klausimą ar SCF¹⁻¹⁶⁴ yra c-kit ligandas, pilną murininį c-kit kDNR (Qu et al, EMBO J., 7, 1003-1011, 1988) sustiprino naudojant PCR iš reaguojančios su SCF1-164 ląstelių linijos MC/9 (Nabeli et al, Nature, 291, 332-334, 1981), esant pradmenims, sukonstruotiems iš publikuotų sekų. Ligandinius ryšius ir transmembranines žmogaus c-kit sritis, koduojančias aminorūgštis 1-549 (Jarden et al, EMBO J., 6, 3341-3351, 1987), naudojant analogiškas metodikas, klonavo iš žmogaus eritroleukemijos ląstelių linijų, HEI (Martin ir Capajonnopulu, Sci., 216, 1233-1235, 1982). kDNR c-kit statė į žinduolių ekspresijos vektorių V19.8, paveiktą transfekcijos į CO-1 ląstelę ir gavo membranines frakcijas analizei, ryšiui naudojant žiurkės ir žmogaus ¹²⁵I-SCF1-164, pagal aprašytus žemiau, skyriuose B ir C, būdus. 17 lentelėje pateikti tipinės surišimo analizės duomenys. Specifinio surišimo ¹²⁵I žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ su COS-1 ląstelėmis transfekuotomis tiksliai su V19.8, nebuvo rasta. Tačiau, COS-1 ląstelės ekspresuojančios

rekombinantinio žmogaus hc-kit ligandinį ryšį, plius transmembraninės sritys (hc-kit-LTI) nesuriša $^{125}\text{SCF}^{1-164}$ (17 lentelė). Nežymėto žmogaus SCF^{1-164} 200-kartinio moliarinio pertekliaus pridėjimas, surišimo laipsnį pažemina iki fono lygio. Analogiškai, CO-1 ląstelės transfekuotos murininiu pilno ilgio c-kit (hckit-LTI) suriša žiurkės $^{125}\text{I-SCF}^{1-164}$. Nedidelį kiekį surišto žiurkės $^{125}\text{I-SCF}^{1-164}$ aptiko COS-1 ląstelių transfektantuose būnant tikrai V19.8 ir vėl buvo stebima netransfekuotose ląstelėse (pieš. neparodyta), kas reiškia, kad COS-1 ląstelės ekspresuoja endogeninį c-kit. Gautas rezultatas atitinka platų c-kit ekspresijos ląstelių paplitimą. Žiurkės $^{125}\text{I-SCF}^{1-164}$ analogiškai susiriša tiek su žmogaus, tiek su murininiu c-kit, tada kai žmogaus $^{125}\text{I-SCF}^{1-164}$ susiriša esant žemesniam aktyvumo laipsniui su murininiu c-kit (17 lentelė). Šie duomenys atitinka SCF^{1-164} kross-reakcijos savybių tarp fragmentų, žemėlapiui. Žiurkės SCF^{1-164} indukuoja žmogaus kaulų čiulpų proliferaciją esant santykiniam aktyvumui analogiško SCF^{1-164} , tada, kai žmogaus SCF^{1-164} indukuoja murininių ląstelių proliferaciją, kas yra 800 kartų mažiau negu žiurkės baltymo atveju.

Sumuojant aukščiau gautus rezultatus, galima sakyti, kad jie patvirtina tą faktą, kad fenotipiniai nukrypimai ekspresuotų w ar SI mutantinių pelių yra pirminių receptorių-ligandinių ryšių su c-kit, pasekmė, ir turi lemiamą reikšmę vystytis įvairių tipų ląstelėms.

17 lentelė

SCF^{1-164} susirišimas su rekombinantiniu c-kit, ekspresuotu COS-1 ląstelėse

Plazmidė	Žmogaus SCF^{1-164}		Surištas CPM ^a žiurkės SCF^{1-164}	
	$^{125}\text{J-SCF}^b$	$^{125}\text{J-SCF+cold}^c$	$^{125}\text{J-SCF}^d$	$^{125}\text{J-SCF+cold}^e$
Transfekuotas				
V19.8	2.160	2150	1.100	550
V19.8:hckit-LTI	59.350	2.380	70.000	1.100
V19.8:mckit-LI	9.500	1.100	52.700	600

a-vidurkinė reikšmė iš dviejų išmatavimų; eksperimentą nepriklausomai atliko 3 kartus ir gavo analogiškus rezultatus.

b-1.6 nM žmogaus $^{125}\text{J-SCF}^{1-164}$

c-1.6 nM žmogaus $^{125}\text{J-SCF}^{1-164}$ +320 nM nežymėto žmogaus SCF^{1-164}

d-1.6 nM žiurkės $^{125}\text{J-SCF}^{1-164}$

e-1.6 nM žiurkės $^{125}\text{J-SCF}^{1-164}$ +320 nM nežymėto žiurkės SCF^{1-164}

B. Rekombinantinio c-kit ekspresija į COS-1 ląsteles

kDNR ir murininio c-kit klonus gavo naudodami PCR metodus (Saiki et al, Sci., 239, 487-491, 1988) iš pilnos RNR, išskirtos ekstrakcijos sistemos parūgštintas fenolis/chloroformas metodu (Chomčinski ir Saši, Anal.Bioch, 162, 156-159, 1987), atitinkamai iš žmogaus eritroleukemijos ląstelių linijos HEI ir ląstelių MC/9. Speciali oligonukleotidų seka buvo sukonstruota iš publikuotų žmogaus ir murininių c-kit sekų.

Viengrandę kDNR susintetino iš pilnos RNR pagal metodikas, numatančias fermentinę, Mo-M1V atgalinę transkripciją (Betesda Riserch lab., Betesda, MD) naudojant antijautrius c-kit oligonukleotidus vietoje pradmens. Persidengiančių c-kit dalių ligandinio ryšio ir tirozinkinazės sričių sustiprėjimas buvo vykdomas atitinkamai naudojant porą pradmenų c-kit. Tokias sritis klonavo į ekspresuotą žinduolių vektorių V19.8 (Fig.17) dėl COS-1 ląstelių ekspresijos. Kelių klonų DNR sekos nustatymas įgalino nustatyti nepriklausomas mutacijas, atsiradusias kiekviename klone, matomai, PCR sustiprinimo metu. Neturintys tokių mutacijų klonai buvo konstruoti iš atskirų klonų pašalinant mutacijų nesudariusius fragmentus. Kai kurie skirtumai su publikuotomis sekomis buvo rasti visuose arba beveik visuose klonuose; ir buvo padaryta išvada, kad tikros sekos būna naudojamose ląstelių linijose ir jos gali turėti alelinių skirtumų nuo publikuotų sekų. Pateiktos žemiau plazmidės buvo konstruojamos V19.8, V19.8:mckit-LTI pilnam murininiam c-kit; o taip pat V19.8:hckit-LI, turinčiame ligandinius ryšius plus žmogaus c-kit transmembraninę sritį (1-549 aminorūgštys).

Plazmidės buvo transfekuotos į COS-1 ląsteles atitinkamai pagal 4 pvz. metodiką.

C. $^{125}\text{J-SCF}^{1-164}$ susirišimas su COS-1 ląstelėmis, ekspresuojančiomis c-kit

Po dviejų dienų po transfekcijos COS-1 ląsteles nukrapštė nuo objektinio stikliuko, praplovė PBS ir užšaldė iki kito naudojimo.

Po atšildymo ląsteles pakartotinai suspendavo 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl_2 , turinčiu 1 mM PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ aprotinino, 25 $\mu\text{g/ml}$ leupeptino, 2 $\mu\text{g/ml}$ pepstatino ir 200 $\mu\text{g/ml}$ TICK-HCl. Suspensiją dispergavo 5-kartiniu pipetavimo būdu, inkubavo lede

15 min. ir ląsteles homogenizavo 15-20 Daunso homogenizatoriaus ciklais. Į homogenatą pridėjo sacharozės (250 mM) ir branduolių frakcijos ir likusias nesuardytas ląsteles centrifugavo 500xg, 5 min. Viršutinį sluoksnį centrifugavo 25000xg, 30 min. 4°C temperatūroje, kad nusėstų likusios ląstelių nuolaužos.

Žmogaus ir žiurkės SCF¹⁻¹⁶⁴ žymėjo radioaktyviu jodu naudojant chloraminą-T (Chanter ir Greenvod, Nature, 194, 495-496, 1962). COS-1 membraninę frakciją inkubavo kartu su žmogaus ar žiurkės ¹²⁵J-SCF¹⁻¹⁶⁴ (1.6 nm) esant arba nesant 200 kartiniam moliariniam pertekliui nežymėto SCF¹⁻¹⁶⁴ surišančiame buferyje, sudarytame iš RPM 1 pridedant 1% veršiuko serumo albumino ir 50 mM HEPES (pH 7.4) 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos, membraniniai preparatai atsargiai užnešami sluoksniais ant 150 µl ftalio aliejaus ir buvo centrifuguoti 20min. Beckmano mikrofugoje 11, siekiant atskirti membraninius-surištus ¹²⁵J-SCF¹⁻¹⁶⁴ nuo nesurištų ¹²⁵J-SCF¹⁻¹⁶⁴. Po centrifugavimo nuosėdas išmetė ir įvertino surišto su membranomis ¹²⁵J-SCF¹⁻¹⁶⁴ kiekį.

16 pavyzdys

Žmogaus SCF DNR išskyrimas

A. HT-1080 kDNR bibliotekos konstravimas

Pilną RNR išskyrė iš HT-1080 žmogaus fibrosarkomos ląstelių linijos (ATCC CCI 121) ekstrakcijos sistemoje: rūgštus tiocianat-guanidinas -fenolio-chloroformas (Chomčinski ir kt., Anal.Bioch., 162, 156, 1987), ir poli(A) RNR išskyrė naudodami oligo (dT) koloną firmos Clontech. Dvisiulę DNR gavo iš 2 µg poli (A) rnr pagal BRI metodiką (Betesda Reach.Lab.) kDNR sintezės pagal tiekėjų rekomenduojamas sąlygas. Maždaug 100 ng kolonoje frakcionuotos dvisiulės DNR, kurių vidutinis dydis apie 2 kD, ligavo su 300 ng Sa 11/NotI perdirbtu vektoriniu pSPORT 1 (d'Alessio ir kt., Focus, 12, 47-50, 1990) ir transformavo į DN5a (BI, Bethesda, MD) ląsteles elektroporacijos būdu (Dayer ir kt., Nucl.Acids Res., 16, 6127-6145, 1988).

B. kDNR bibliotekos skринingas

Apie 2.2x10⁵ pirminių transformantų paskirstė į 44 grupes, kiekvienoje po maždaug 5000 individualių klonų. Plazmidinę DNR gavo iš kiekvienos grupės nusodinimo metodu CTAB-DNR (Del Sal ir kt., Biotechnology, 7, 514-519, 1989).

2 µg kiekvienos plazmidinės DNR veikė ribotu fermentu Not 1 ir atskyrė del-
elektroforeze. Linearizuotą DNR pernešė ant GenScreen Plus membranų (Diupon) ir
hibridizavo su ³²P-žymėtu PCR-generuojančiu žmogaus SCF kDNR (3 pvz.) anksčiau
aprašytais sąlygomis (Leen ir kt., Proc.Nat.Acad.Sci., JAV, 82, 7580-8584, 1985).
Hibridizacijos rezultate identifikavo 3 grupes turinčias teigiamą signalą. Šias kolonijų
grupės pakartotinai atliko skryningą pagal kolonijų hibridizacijos metodiką (Leen ir
kt., Gene, 44, 201-209, 1986) iki to laiko, kol iš kiekvienos grupės gavo po vieną
koloniją. kDNR dydžiai tokiuose trijuose išskirtuose klonuose buvo 5.0-5.4 kD.
Ribojantis fermentų poveikis ir nukleotidų sekų 5' gale nustatymas parodė, kad 2 klonai
iš trijų yra identiškai vienas kitam (10-1a ir 21-7a). Abu tokie klonai turi koduojamą sritį ir
apie 200 kD 5' netransliuotos srities (5' UTR). Trečias klonas (26-1a) 5' gale 400 kD
trumpesnis, negu kiti du klonai. Tokia žmogaus SCF kDNR seka parodyta Fig.42.
Reikia ypač pažymėti hidrofobinę transmembraninę seką, prasidedančią aminorūgštimi
186-190 srityje ir besibaigiančią ties 212 aminorūgštimi.

C. pDSRa2hSCF¹⁻²⁴⁸ konstravimas

pDSRa2hSCF¹⁻²⁴⁸ generavo naudodami plazmidę 10-1a (pagal 16B aprašymą) ir
pGEM3hSCF¹⁻¹⁶⁴ tokiu būdu: Hind III iš pCEM3 SCF¹⁻¹⁶⁴ perkėlė į M13 p18.
Nukleotidus, esančius virš ATG inicijuojančio kodono pakeitė sait-kontroliuojama
mutageneze CTTTCCTT ATC į GCCGCCGCC ATC naudodami antijautrų
oligonukleotidą

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

ir mutagenezės sistemas *in vitro* valdomas oligonukleotidais pagal Amersham Corp.
metodikas, siekiant M13mp18 hSCF^{K1-164}. Tokią DNR veikė su HIND III ir įterpė į
pDSRa2, kurią veikė HIND III: klonas pDSRa2 hSCF^{K1-164}. DNR iš pDSRa2 hSCF^{K1-164}
veikė XdaI ir gavo DNR bukais galais, pridėję Klionovo ir keturis dNTP. Po tokio DNR
reakcijos nutraukimo papildomai veikė fermentu S peI. Kloną 10-1a veikė DraI, kad
susidarytų bukas galas 3' ir SpeI nupjauna šiame saite geno viduje kaip ir pDSRa2
hSCF^{K1-164}, taip ir 10-1a. Tokias DNR kartu ligavo, kad gautų pDSRa2 hSCF^{K1-248}
generaciją.

D. COS ląstelių transfekcija ir imunonuosėdymas esant pDSRa2 hSCF^{K1-248} DNR.

COS-7 ląstelės (ATCC SR I 1651) transfekavo DNR pagalba pagal ankstesnį aprašymą. 4×10^6 ląstelių sistemoje iš 0.8ml DEM+5%FBS veikė elektroporacija, 1600 V įtampa, esant 10 μ g pDSRa2 hSCF^{K1-248} DNR arba 10 μ g pDSRa2 vektorine DNR (kontrolės vektorius). Po elektroporacijos pakartotinai išsėjo į dvi lėkšteles po 60 mm diametro. Po 24 val. terpę pakeitė šviežia pilna terpe.

Po 72 val. po transfekcijos kiekvieną lėkštelę žymėjo ³⁵S-terpe pagal Jardeno ir kt. (PNAS 87, 2569-2573, 1990) modifikacijos protokolą. Ląsteles praplovė fosfatiniu buferiu ir po to 30min. inkubavo DMEM neturinčia metionino ir cisteino (Met-Cys-DMEM).

Terpę nupylė ir į kiekvieną lėkštelę pridėjo 1ml Met-Cys-DMEM, kurioje buvo 100 μ Ci/ml Tran³⁵S-žymės (ICN). Ląsteles inkubavo 8 val. 37°C temperatūroje. Terpę su kultūra buvo centrifuguota siekiant pašalinti ląstelių nuolaužas ir užšaldyta -20°C.

Žymėtos kondicinės terpės COS/ pDSRa2 hSCF^{K1-248} ir vektorinės kontrolės COS/pDSRa2 alikvotos imunoišsodintos kartu su ląstelių ³⁵S-žymėtos CHO/ pDSRa2 hSCF^{K1-164} terpės 17 klonų pavyzdžiais (žr. 5 pvz.) pagal Jardeno ir kt., (EMBO, 6, 3341-3351, 1987) metodo protokolus. Vienas ml kiekvieno kondicinės terpės pvz. veiktas 10 μ l preimuniniu triušio serumu (## 1379 P.I.). Pavyzdžius inkubavo 5 val. prie 4°C. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridėjo po 100 μ l 10% *Staphylococcus aureus* suspensijos (Pansorbin, Calbiochem) į 0.15 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0.2% tritono X-100. Pavyzdžius inkubavo dar 1 val. 4°C temp. Imuninius kompleksus nucentrifugavo 13.000xg 50 min. Supernatantus supylė į naujus mėgintuvėlius ir inkubavo su 5 μ l triušio poliklonalinio serumo (## 1381 TB4), išvalyto kaip parodyta 11 pvz., atitinkamai gauto iš CHO hSCF¹⁻¹⁶² per naktį 5°C. Valandos bėgyje pridėjo 100 μ l pansorbino ir imuninius kompleksus nusodino pagal ankstesnį aprašymą.

Po centrifugavimo likusias nuosėdas praplovė lizavimo buferiu (0.5% Na-dezoksicholato, 50 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8), tris kartus vandeniniu buferiu (0.5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0.2% Tritono X-100) ir vieną kartą 20 mM Tris pH 7.5. Nuosėdas pakartotinai suspendavo 50 μ l 10mM Tris pH 7.5, 0.1 % SDS, 0.1 M β -merkaptioetanoliu. SCF baltymą eliuavo verdant 5 min. Pavyzdžius centrifugavo 13000xg 5 min. ir išskyrė supernatantą.

Glikozidazėmis veikė tokiu būdu: 3 μ l 75 mM CHAP turinčio 0.6 mU O-glikanazės ir 0.02 U neuraminidazės pridėjo į 25 μ l inkubuotus 3 val. prie 37°C, imuninius pavyzdžio kompleksus. Pridėjo tokį patį turį 2x PACE buferio ir pavyzdžius virino 3 min. Virti ir nevirti pavyzdžiai užnešti į elektroforezę ant 15 % SDS-poliakrilamidinio redukuojančio gelio per naktį prie 8 mA srovės. Gelį fiksavo metanolio-acto rūgšties sistemoje, su sustiprintoju Enlightening (NeN) 30min., džiovino ir eksponavo ant Kodak XAR-5 plėvelės -70°C.

Fig.43 parodyta gautų rezultatų autoradiograma. 1 ir 2 pozicijose yra kontrolinių COS/pDSRa2 kultūrų pavyzdžiai, 3 ir 4-pavyzdžiai COS/pDSRa2 hSCF^{K1-248}, pozicijos 5 ir 6-COS/pDSRa2 hSCF^{K1-164}. 1, 3 ir 5 pozicijos yra nesuardytos imuninės nuosėdos; 2, 4 ir 6 buvo suardyti dalyvaujant glikanazėms, kaip aprašyta aukščiau. Kairėje parodyta markerių molekulinės masės. Apdorojimas SCF COS transfekuotų pDSRa2 hSCF^{K1-248} aiškiai parodo, kad yra analogiškas hSCF^{K1-164}, sekretuoto iš CHO ir transfekuoto pDSRa2 hSCF^{K1-164}, apdorojimui (pvz. 11). Gautas rezultatas patvirtina tą faktą, kad prigimtinis proteolitinio veikimo išskiriantis iš ląstelių SCF saitas yra arti 164 aminorūgšties.

17 pavyzdys

Žmogaus SCF ketvirtinės struktūros analizė

Kalibruojant gel-filtracinę koloną (ACA 54) aprašytą 1 pvz., valant SCF iš BRI ląstelių kultūrinio skysčio, molekulinės masės standartų pagalba ir eliuuojant išvalytą SCF iš kitų gel-filtracinių kalibracinių kolonų žinoma, kad išvalytas SCF iš BRI ląstelių terpės yra medžiaga, kurios molekulinė masė apie 70000-90000 lyginant su molekulinės masės standartais. Skirtingai nuo šito, mol. masė pagal SDS-PAGE yra apie 28000-35000.

Nors žinoma, kad glikozilinti baltymai gali elgtis anomaliai tokiose analizėse, gauti rezultatai patvirtina tą faktą, kad žiurkės SCF, esantis BRI darinys, gali egzistuoti kaip nekovalentiškai surištas dimeras nendenatūruojančiomis sąlygomis. Analogiški rezultatai yra ir su rekombinantiniėmis SCF formomis (pvz., žiurkės ir žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴, kurie yra *E.coli* dariniai, o žiurkės ir žmogaus SCF¹⁻¹⁶² yra CHO ląstelių dariniai), todėl, kad molekulinis dydis nustatytas gel-filtracijos metodu nendenatūruojančiomis sąlygomis du

kartus yra didesnis po gel-filtracijos denatūruojančiomis sąlygomis (pvz., esant SDS ar SDS-PAGE metodu) kiekvienu konkrečiu atveju.

Be to, analizė pagal nusėdimo greitį, kas atitinka molekulinę masę, duoda molekulinės masės dydžius apie 36000 rekombinantinio žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ iš *E.coli*. Šis dydis taip pat beveik du kartus didesnis, negu buvo gauta SDS-PAGE metodu (apie 18000-19000). Todėl, nors yra žinoma, kad gali būti daug oligomerinių darinių (įskaitant monomerus), matomai, kai kuriais atvejais tirpale dominuoja dimerai.

18 pavyzdys

Žmogaus SCF kDNR klonų išskyrimas iš 5637 ląstelių linijos

A. Bibliotekos 5637 kDNR konstravimas.

Pilną RNR išskyrė iš žmogaus šlapimo pūslės karcinomos ląstelių (ATCC HTB-9) naudojant ekstrakcijos metodus su rūgštaus tiocianato guanidino-fenolio-chloroformo sistema (Chomčinski ir kt., Anal.Bioch., 162, 156, 1987) ir poli(A) RNR išskyrė naudodami oligo(dT) nugaros kolonas, teikiamas Klontex firmos. Dviejų siūlų kDNR gavo iš 2 µg poli(A) RNR naudojant B I rinkinį kDNR sintezei tiekėjo rekomenduojamomis sąlygomis. Apie 80 ng frakcionuotos kolonoje dviejų siūlų kDNR, kur vidutiniškai 2kD ligavo su 300 ng Sall/NotI vektoriu pSPORT I (d'Alessio ir kt., Focus, 12, 47-50, 1990) ir transformavo į ląsteles DN5a elektroporacija (Dover ir kt., Nucl.Acids, Res, 16, 6127-6145, 1988).

B. kDNR bibliotekos sudarymas

Apie 1.5x10⁵ pirminių transformantų suskirstė į 30 porcijų, kurių kiekviena turėjo apie 5000 individualių klonų. Plazmidinę DNR gavo iš kiekvienos partijos CTAB-DNR nusodinimo metodu (Del Sal ir kt., Biotechniques, 7, 514-519, 1989). Du µg iš kiekvienos partijos plazmidinės DNR ardė fermentu NotI ir skyrė gel-elektroforeze. Linijinę DNR pernešė ant Henskrin Plius membranos (Liupon) ir hibridizavo su kDNR ³²-P-žymėtu žmogaus pilno ilgio SCF, išskirtu iš HT1080 linijos (16 pvz.) naudojant anksčiau aprašytas sąlygas (Leen ir kt., Proc.Natl.Acad.Sci, USA, 82, 7580-7584, 1985).

Hibridizacijoje identifikavo 7 partijas, turinčias teigiamą signalą. Partijų kolonijas pakartotinai išskirstė pagal kDNR ³²-P-žymėto žmogaus SCF PCR (3 pvz.), pagal

kolonijų hibridizacijos metodiką (Leen ir kt., Gene, 44, 201-209, 1986) tol, kol iš keturių partijų liko tik viena. Keturių išskirtų klonų dydis buvo apie 5.3 kD. Ardymas ribojančiu fermentu ir 5'-galo klonų nukleotidinių sekų analizė įgalino identifikuoti keturis klonus. Tokios žmogaus kDNR seka parodyta Fig.44. Fig.44 kDNR koduoja polipeptidas, kurio 149-177 aminorūgščių seka, pavaizduota Fig.42, pakeistos viena Gly liekana.

19 pavyzdys

Išgyvavimo po letalinio apšvitinimo išaugimas, veikiant SCF

A. SCF *in vivo* aktyvumas įtakojantis išgyvavimą po letalinio apšvitinimo.

Buvo tiriamas SCF padedantis išgyventi pelėms po letalinio apšvitinimo. Kaip tiriamuosius objektus naudojo BALB/c pelių pateles 10-12 savaičių amžiaus. Grupės buvo po 5 peles ir kiekvienam eksperimentui pelės buvo parenkamos pagal svorį. Pelės švitino vienkartinėmis dozėmis 850 ir 950 rad. Pelėms įvedė tik faktorius arba faktorius su normaliomis kaulų čiulpų ląstelėmis BALB pelių. Pirmu atveju, per 24 val po apšvitinimo pelėms į veną buvo suleista žiurkės PEG SCF (20 µg/kg), išskirto iš *E.coli*, ir modifikuoto, pridėdant polietilenglikolio pagal 12 pvz. metodiką, o kontroliniams gyvūnams - fiziologinį tirpalą. Praėjus 4 val. po apšvitinimo, pelėms į veną suleido skirtingas dozes normalių BALB pelių kaulų čiulpų ląstelių. Žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ apdorojimą vykdė pridėdami 200 µg/kg žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ į ląstelių suspensiją likus 1 val. iki injekcijos ir vykdant vienkartinę faktoriaus kartu su ląstelėmis, injekciją.

Po apšvitinimo 850 rad. doze pelėms įvedė žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ arba fiziologinį tirpalą. Gauti rezultatai pateikti Fig.45. Žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ įvedimas žymiai prailgino pelių išgyvenimo trukmę po apšvitinimo, lyginant su kontroline grupe ($P < 0.001$). Pelės, injekuotos fiziologiniu tirpalu išgyveno vidutiniškai 7.7 dienos, kai pelės su PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ išgyveno vidutiniškai 9.4 dienos (Fig.45.)

Rezultatai, pateikti Fig.45, yra sumuoti duomenys skirtingų eksperimentų, naudojant kiekvienoje bandymo grupėje po 30 pelių.

Pelių, apdorotų PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ išgyvenimas rodo SCF įtaką apšvitintų gyvūnų kaulų čiulpų ląstelėms. Išankstiniai tokių gyvūnų hematologinių parametrų tyrimai rodo tam tikrus trombocitų lygio padidėjimus po 5 dienų po apšvitinimo, lyginant su kontroliniais gyvūnais. Tačiau po 7 dienų po apšvitinimo trombocitų lygis tik nežymiai skiriasi nuo

kontrolinės grupės. Nebuvo užfiksuoti skirtumai RBC ir SBC lygio kaulų čiulpų ląstelių struktūroje.

B. Transplantuotų pelių, apdorotų SCF, išgyvenimas

Normalių BALB/c pelių klubų kaulų čiulpų ląstelių 10 % dozės transplantuotos 850 rad apšvitintoms pelėms, gali išgelbėti 90 % ir daugiau gyvūnų (duomenys nepateikti). Todėl 850 rad dozė buvo naudojama dozuojuojant transplantantą į 5 % klubo kaulo, siekiant nustatyti žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ įtaką išgyvenimui. Esant tokiai dozei, buvo laukiama, kad didelis procentas pelių, negavusių SCF negali išgyventi; jeigu žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ gali stimuliuoti transplantuotas ląsteles, tai gali būti didesnė išgyvenimo galimybė. Kaip parodyta Fig.46, apie 30 % kontrolinių pelių išgyvena 8 dienas po apšvitinimo. Apdorojimas žiurkės PEC-SCF¹⁻¹⁶⁴ žymiai sustiprina išgyvenimą, nors 95 % tokių pelių išgyvena kraštutiniu atveju, net 30 dienų (Fig.46). Fig.46 pateikti rezultatai yra 4 atskirų eksperimentų, kuriuose naudojo po 20 pelių kontrolinėje ir tiek pat apdorotose PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ grupėse, vidurkiai. Esant daug didesnėms apšvitinimo dozėms, veikimas žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ kartu su kaulų transplantantu taip pat žymiai padidina išgyvavimą (Fig.47). Kontrolinės pelės apšvitintos 950 rad doze ir transplantuotos 10% klubų kaulo, žuvo 8 dieną, kai maždaug 40% pelių paveiktų žiurkės PEG-SCF¹⁻¹⁶⁴ išgyveno 20 dienų ir 20% kontrolinių pelių transplantuotų 20% klubų kaulų išgyveno per 20 dienų, kai 80% gyvūnų, paveiktų SCF, išgyveno šį laiką (Fig.47).

20 pavyzdys

Monokloninių antikūnų prieš SCF produkavimas

BALB pelių patelėms, 8 savaičių amžiaus (C.River, Wilmington. MA) buvo daromos poodinės injekcijos 20 µg žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ ekspresuoto *E.coli*, Freundo pilname stimulatoriuje (H37-Pa; Difco lab., Detroit, MI). Pakartotinai imunizavo 50 µg šio antigeno Freundo stimulatoriuje 14, 38 ir 57 dienas. Praėjus trims dienoms po paskutinės injekcijos, 2 peles papjovė ir paėmė jų blužnis su mielomine linija SP 2/0 pagal metodiką, aprašytą Novinskio ir kt., (Virusologija, 93, 111-116, 1979).

Ląstelių kultūrai SP 2/0 ir hibridomai naudojama terpė buvo modifikuota Dulbeko terpė Iglā (DMEM) (Gibco, Ohaio) papildyta 20% termodezaktyvuotu veršiuko serumu (Fibro, Chem., NY), 110 mg/ml natrio piruvato, 100 vnt/ml streptomicino (Gibco). Po ląstelių sujungimo hibridus selekcino HAT terpėje, kurioje buvo 10^{-4} M hipoksantino, 4×10^{-7} M aminopterino ir 1.6×10^{-5} M timidino dvi savaites, po to dvi savaites kultivavo terpėje turinčioje hipoksantiną ir timidiną.

Hibridomas rūšiavo tokiu būdu: polistirolinius rezervuarus (Costar, MA) sensibilizavo 0.25 µg žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ (*E.coli*) 50 µl 50 mM bikarbonatinio buferio, pH 9.2 dvi valandas kambario temperatūroje, po to per naktį 4°C. Po to plokštes blokavo 5% BSA/PBS 30 min. kambario temperatūroje, po to inkubavo hibridominės kultūros nuosėdų sluosniu 1 val. 37°C temperatūroje.

Tirpalą dekantavo ir surištus antikūnus inkubavo skiedžiant 1:500 ožio anti-pelės IgG konjugatu su peroksidaze (Boeringer Mannheim Biochemicals, I N) 1 val. 37°C. Plokštes plovė plovimo buferiu (KPI, Haitsburg, MD), po to ryškino H₂O₂ ir ABT mišiniu (KPI). Matavo kolorimetriškai ties 405 nm.

Ląstelių hibridominės kultūros sekretuojančios specifinius SCF¹⁻¹⁶⁴ (*E.coli*) antikūnus analizavo ELISA. Hibridomas subklonavo ribojančio praskiedimo metodu. 55 rezervuarai tiriamų hibridų pasižymėjo aktyvumu žmogaus SCF¹⁻¹⁶⁴ (*E.coli*); 9 iš jų pasižymėjo aktyvumu žmogaus SCF¹⁻¹⁶² (CHO) atžvilgiu.

Kai kurias hibridomas ląsteles klonavo tokiu būdu:

Monoklonas	IgG tipas	Reakcija į žmogaus SCF ¹⁻¹⁶² (CHO)
4Q12-13	IgG1	nėra
6C9A	IgG1	nėra
8H7A	IgG1	yra

Hibridomas 4C12-13 ir 8H7A buvo deponuotos ATCC 1990 rugsėjo 26 d.

Nors šis išradimas buvo aprašomas remiantis priešlaikiniu įgyvendinimu, reikia turėti omenyje, kad šios srities specialistas gali turėti reikalų su pakeitimais ir modifikacijomis. Todėl laikoma, kad pateikta išradimo formulė apima ekvivalentinius variantus, kuriuos apima šio išradimo sfera.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Negamtinės kilmės polipeptidas, turintis aminorūgščių seką, iš esmės dubliuojančią seką, randamą gamtoje kamieninių ląstelių faktoriuje, kurios dėka įgyja gamtinio kamieninių ląstelių faktoriaus hemopoetinį biologinį aktyvumą.
2. Išvalytas polipeptidas, esantis randamu gamtoje kamieniniu ląstelių faktoriumi.
3. Polipeptidas pagal 1 ir 2 punktus, besiskiriantis tuo, kad yra prokariotinės ar eukariotinės egzogeninės DNR sekos ekspresijos produktas.

4. Polipeptidas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra CHO ląstelių ekspresijos produktas.
5. Polipeptidas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seka yra kDNR seka.
6. Polipeptidas pagal 1 ir 2 punktus, besiskiriantis tuo, kad nurodytas kamieninių ląstelių faktorius yra žmogaus kamieninių ląstelių faktorius.
7. Polipeptidas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seka yra genominės DNR seka.
8. Polipeptidas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seką perneša ant autonomiškai replikuojančios plazmidinės DNR arba virusinio vektoriaus.
9. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pilnai ar dalinai turi žmogaus kamieninių ląstelių faktoriaus aminorūgščių seką, parodytą Fig.15B, 15C, 42 ir 44, o Fig.15B, 15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis, arba bet koki gamtoje randamą jos alelinį variantą.
10. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad *in vivo* pasižymi gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus biologiniu aktyvumu.
11. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad *in vitro* pasižymi gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus biologiniu aktyvumu.
12. Polipeptidas pagal 1 ir 2, punktus papildomai besiskiriantis tuo, kad yra kovalentiškai sujungtas su detekcine medžiaga-žyme.
13. Izoliuota DNR seka, naudojama polipeptidinio produkto, turinčio aminorūgščių seką, iš esmės dubliuojančią gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus seką, ir dėl to turinčio gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus kraujodaros biologinį aktyvumą, ekspresijai prokariotinėje ar eukariotinėje ląstelėje, ir kai nurodyta DNR priklauso:
 - a) DNR sekoms, pateiktoms Fig.14B, 14C, 15B, 15C, 42, 44, o Fig. 14B, 14C, 15B, 15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis, arba joms komplementarioms grandinėms;
 - b) DNR sekoms, kurios hibridizuojasi su DNR sekomis, nurodytomis a) ar jų fragmentams; ir

c) DNR sekoms, turint omenyje genetinio fondo išsigimimą, hibridizuojamoms su DNR sekomis, nurodytomis a) ir b).

14. Prokariotinė ar eukariotinė ląstelė-šeimininkė, besiskirianti tuo, kad yra transformuota ar transfekuota DNR seka, nurodyta 13 punkte, tokiu būdu, kad ląstelė-šeimininkė ekspresuoja nurodytą polipeptidinį produktą.

15. DNR sekos, nurodytos 13 punkte, ekspresijos prokariotinėse ar eukariotinėse ląstelėse, polipeptidinis produktas.

16. Izoliuota DNR seka, koduojanti ekspresuojamą prokariotinėje ar eukariotinėje ląstelėje polipeptidą, turintį aminorūgščių seką iš esmės dubliuojančią gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus seką, kas įgalina jį turėti gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus kraujodaros biologinį aktyvumą.

17. Seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra kDNR-seka.

18. Seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra genominė DNR-seka.

19. Seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji koduoja žmogaus kamieninių ląstelių faktorių.

20. DNR seka pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi vieną ar daugiau kodonų, pageidaujamų ekspresijai *E.coli* ląstelėse.

21. DNR seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji atitinka sekas, parodytas Fig.15B, 15C, 42 ir 44, o Fig.15B, 15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis.

22. DNR seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi vieną ar daugiau kodonų, pageidaujamų ekspresijai mielių ląstelėse.

23. DNR seka pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad ji kovalentiškai sujungta su detekcine medžiaga-žyme.

24. DNR seka, koduojanti gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus polipeptidinį fragmentą ar polipeptidinį analogą.

25. DNR seka pagal 24 punktą, besiskirianti tuo, kad ji koduoja kamieninių ląstelių metionilintą faktorių.

26. Biologiškai funkcionali plazmidė ar virusinės DNR vektorius, turintis DNR seką pagal 16 punktą.

27. Prokariotinė ar eukariotinė ląstelė-šeimininkė, besiskirianti tuo kad ji yra stabiliai transformuota ar transfekuota DNR-vektoriais pagal 16 punktą.

28. DNR sekos pagal 16 punktą ekspresijos prokariotinėse ar eukariotinėse ląstelėse polipeptidinis produktas.

29. Polipeptidas, turintis dalinę ar pilną aminorūgščių seką, parodytą Fig.15C, 42 ar 44, o Fig.15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis, ir pasižymintis *in vitro* vienu ar daugiau gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus biologiniu aktyvumu.

30. Polipeptidas, turintis dalinę ar pilną antrinę gamtoje randamo kamieninių ląstelių faktoriaus konformaciją ir turintis dalinę ar pilną aminorūgščių seką, parodytą Fig.15C, 42 ar 44, o Fig.15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis, ir pasižymintis gamtoje randamo žmogaus kamieninių ląstelių faktoriaus biologinėmis savybėmis.

31. Kamieninių ląstelių faktoriaus gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad:

tinkamose mitybinėse terpėse augina prokariotines ar eukariotines ląsteles-šeimininkes,

transformuoja ar transfekuoja DNR pagal 13 punktą, ir

išskiria pageidaujamus nurodyto vektoriaus DNR-sekos ekspresijos polipeptidinius produktus.

32. Kompozicijos, besiskiriančios tuo, kad turi išskirtą ir išvalytą žmogaus kamieninių ląstelių faktorių, nesujungtą su koku nors žmogaus baltymu glikozilintoje ar neglikozilintoje formoje.

33. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad ji turi efektyvų polipeptido pagal 1 punktą kiekį ir farmakologiškai priimtina tirpiklį, adjuvantą ar nešiklį.

34. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra skirtas kaulų čiulpų prigijimo laipsnio transplantacijos metu padidinimui, bei kaulų čiulpų atsistatymo, gydant kaulų čiulpų aplaziją ar mielosupresiją, atsiradusią dėl radiacijos, cheminių reagentų poveikio ar chemoterapijos, laipsnio padidinimui,

35. DNR seka, koduojanti žmogaus kamieninių ląstelių faktoriaus analogą, išrinktą iš grupės, kuriai priklauso:

a) (Met¹)kamieninių ląstelių faktorius; ir

b) kamieninių ląstelių faktorius, kuriame vienas ar daugiau cisteinų pakeisti alaninu ar serinu.

36. DNR sekos pagal 35 punktą polipeptidinis produktas, ekspresuotas prokariotinėse ar eukariotinėse ląstelėse-šeimininkėse.

37. Farmcinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad turi rekombinantinį kamieninių ląstelių faktorių, turintį žmogaus faktoriaus aminorūgščių seką ir farmakologiškai priimtina tirpiklį, adjuvantą ar nešiklį.

38. Antikūnai, besiskiriantys tuo, kad jie specifiskai suriša kamieninių ląstelių faktorių.

39. Antikūnai pagal 38 punktą, besiskiriantys tuo, jie yra monokloniniai antikūnai.

40. Kamieninių ląstelių faktoriaus iš SCF-turinčios medžiagos efektyvaus išskyrimo būdas, besiskiriantis tuo, kad vykdo tokios medžiagos jonų-mainų chromatografinio skyrimo stadiją.

41. Būdas pagal 40 punktą, besiskiriantis tuo, kad nurodytas jonų-mainų chromatografinis skyrimas yra anijonų-mainų chromatografinis skyrimas.

42. Būdas pagal 40 punktą, besiskiriantis tuo, kad papildomai atlieka atvirkščios fazės skysčių chromatografijos skyrimo stadiją.

43. Polipeptidas, turintis gamtinės kilmės kamieninių ląstelių kraujodaros faktoriaus biologinį aktyvumą ir turintis aminorūgščių seką, pateiktą Fig.15C, 42 ar 44, o Fig.15C, 42 ir 43 yra šios apibrėžties dalis, arba jo bet koks alelinis variantas, darinys, delecinis analogas arba adityvinis analogas, besiskiriantis tuo, kad jis yra egzogeninės DNR ekspresijos prokariotinėse ar eukariotinėse ląstelėse, produktas.

44. Polipeptidas pagal 43 punktą, besiskiriantis tuo, kad jį parenka iš grupės, kuriai priklauso:

SCF¹⁻¹⁴⁸, SCF¹⁻¹⁶², SCF¹⁻¹⁶⁴, SCF¹⁻¹⁶⁵, (pateikti Fig.15C); SCF¹⁻¹⁸⁵, SCF¹⁻¹⁸⁸, SCF¹⁻¹⁸⁹, ir SCF¹⁻²⁴⁸, (pateikti Fig.42); SCF¹⁻¹⁵⁷, SCF¹⁻¹⁶⁰, SCF¹⁻¹⁶¹, ir SCF¹⁻²²⁰ (pateikti Fig.44), o Fig.15C, 42 ir 44 yra šios apibrėžties dalis.

45. Biologiškai aktyvi kompozicija, besiskirianti tuo, kad turi polipeptidą pagal 44 punktą, kovalentiškai sujungtą su vandenyje tirpstančiu polimeru.

46. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytą polimerą išrenka iš grupės, kuriai priklauso polietilenglikolis arba polietilenglikolio ir polipropilenglikolio kopolimeras, o nurodytas polimeras pakeistas ar nepakeistas iš vieno alkilo grupės galo.

47. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad polipeptidas yra (Met¹)SCF¹⁻

48. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytas polimeras turi vidutinę molekulinę masę 1000-100000 D.

49. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytas polimeras turi vidutinę molekulinę masę 4000-40000 D.

50. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytas polimeras yra nepakeistas polietilenglikolis ar monometoksi polietilenglikolis.

51. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodytą polimerą prijungia prie nurodyto peptido reakcija, kurios metu naudojamas aktyvus karboksi- rūgšties esteris ar nurodyto polimero karboksi-darinys.

52. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad nurodyto baltymo viena ar daugiau aminogrupių surištos su nurodytu polimeru reakcijoje su N-hidroksisukcinimidu, p-nitrofenoliu ar 1-hidroksi-2-nitro-benzen-4-sulfonatinu polimero eteriu.

53. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad viena ar daugiau laisvų cisteino sulfhidrilinių grupių konjuguotos su nurodytu polimeru reakcijos su maleinimidu ar halogenacetilintu polimero dariniu pagalba.

54. Kompozicija pagal 45 punktą, besiskirianti tuo, kad polipeptidas yra glikozilintas produktas, o polimerą prijungia jo aminohidrazino ar hidrazido darinio reakcijos su viena ar keliomis aldehidinėmis grupėmis, gautomis angliavandenių fragmentų oksidavimo metu, pagalba.

55. Biologiškai aktyvaus polimero-polipeptido adukto gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad polipeptido pagal 45 punktą, reakciją atlieka su vandenyje tirpstančiu polimeru sąlygose, leidžiančiose kovalentiškai prijungti polimerą prie nurodyto polipeptido ir išskirti tokiu būdu gauto aduktą.

56. Ankstyvųjų kraujodaros pirmtakų transfekcijos genu būdas, besiskiriantis tuo, kad vykdo:

- 1) kraujodaros pirmtako ankstyvųjų ląstelių kultivavimą, esant SCF; ir
- 2) kultivuojamų ląstelių transfekciją 1) stadijoje genu.

57. Geno perkėlimo būdas žinduoliui, besiskiriantis tuo, kad vykdo stadijas:

- 1) kraujodaros pirmtako ankstyvųjų ląstelių kultivavimą, esant SCF;
- 2) kultivuojamų ląstelių transfekciją 1) stadijoje genu; ir

3) žinduoliams naudoja transfekuotas ląsteles.

58. Polipeptidas pagal 43 punktą, besiskiriantis tuo, kad jį parenka iš grupės, kuriai priklauso:

(Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁴⁸, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁶², (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁶⁴, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁶⁵, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁸³, (15C pieš.); (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁸⁵, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁸⁸, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁸⁹, (Met⁻¹) SCF¹⁻²⁴⁸, (42 pieš.); (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁵⁷, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁶⁰, (Met⁻¹) SCF¹⁻¹⁶¹ ir (Met⁻¹) SCF¹⁻²²⁰.

Fig.1

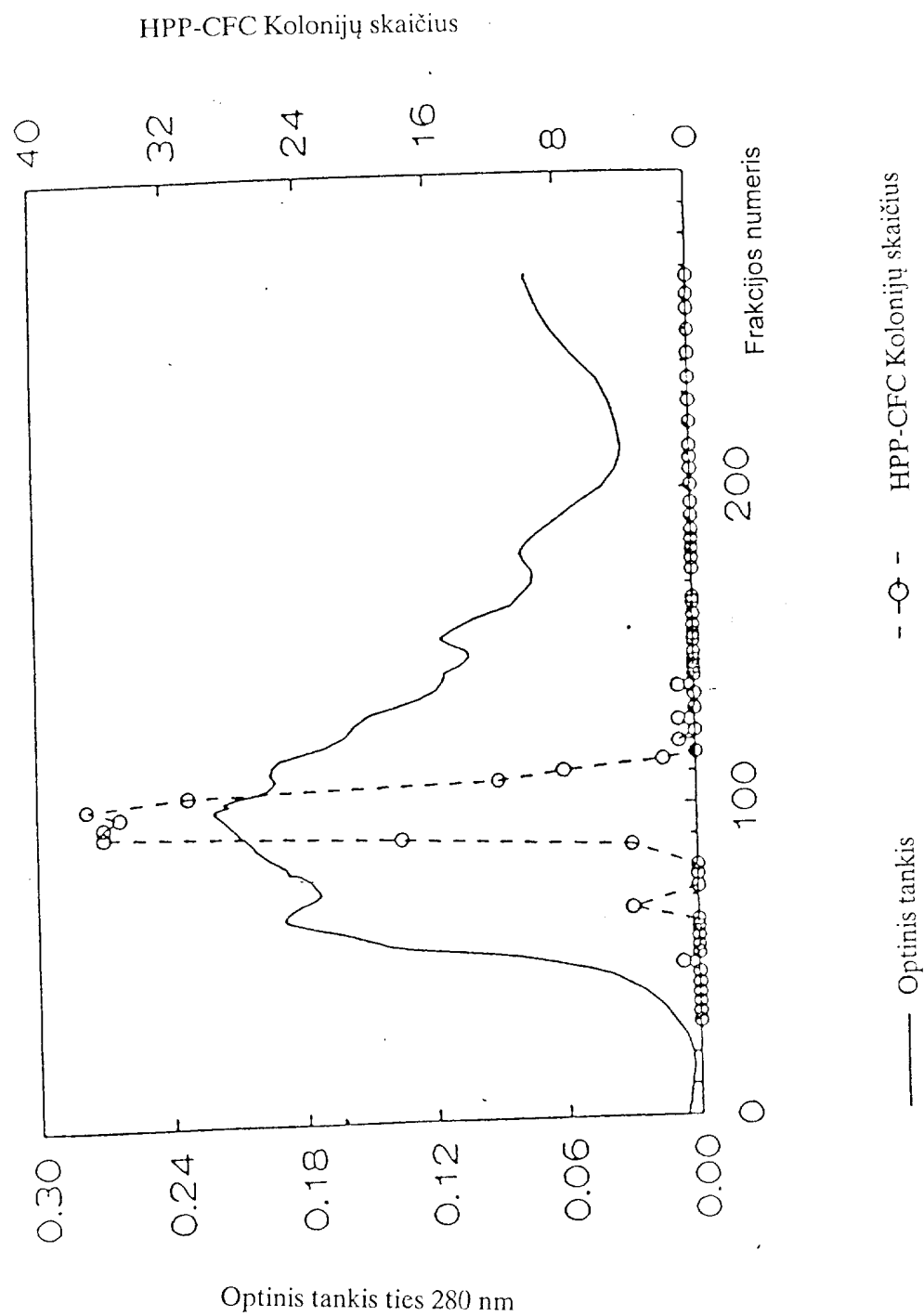


Fig.2

HPP-CFC Kolonijų skaičius

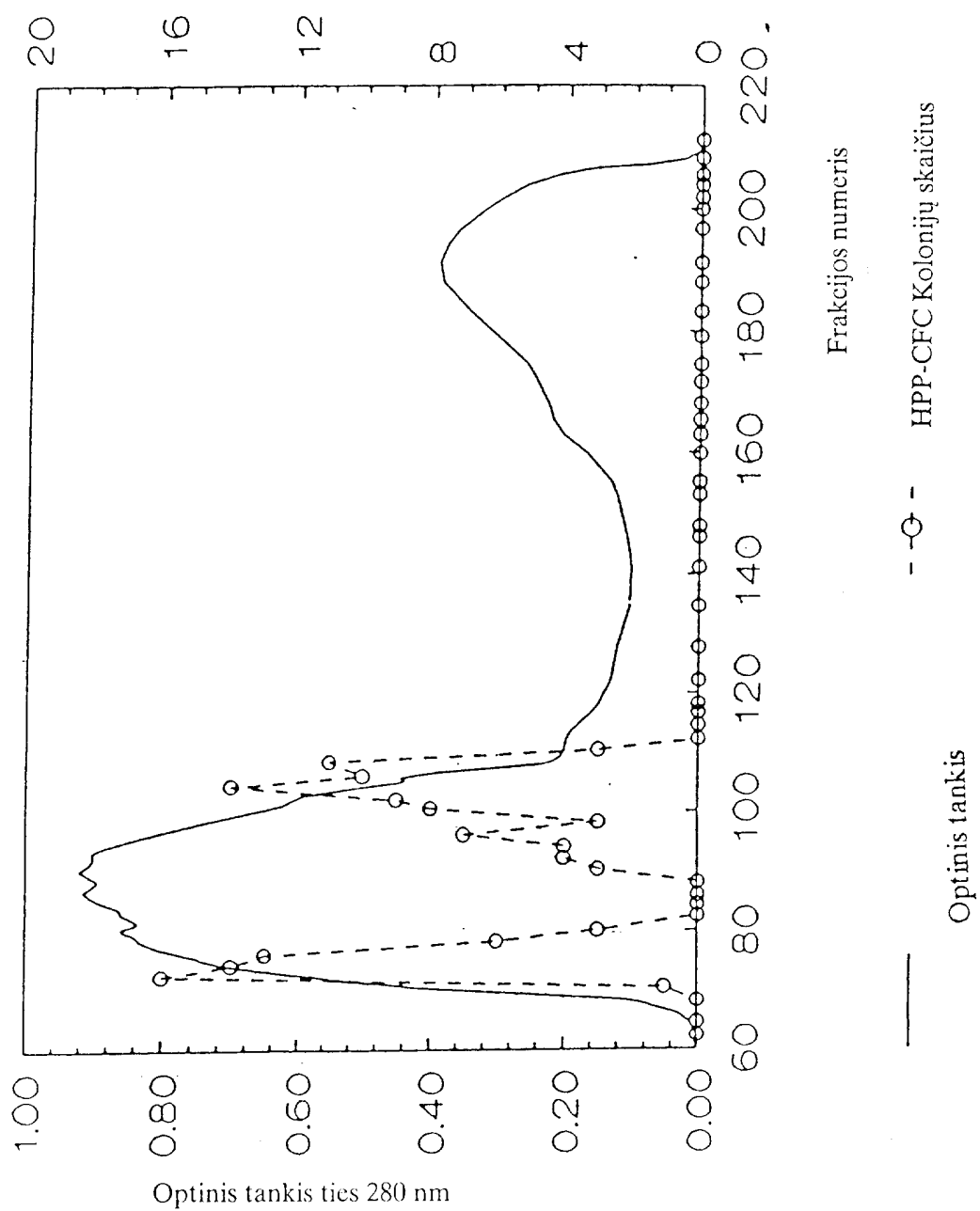


Fig.3

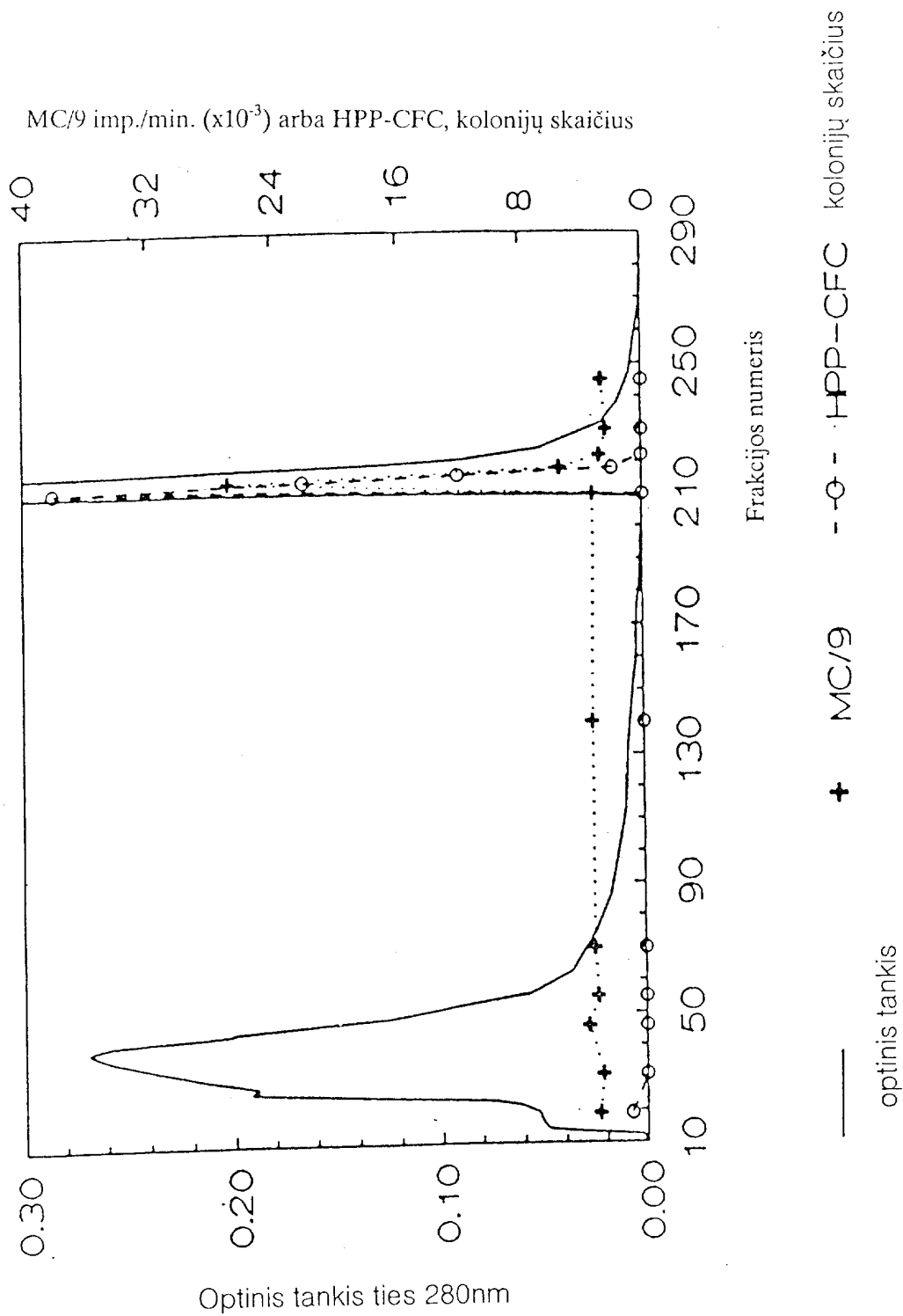


Fig.4

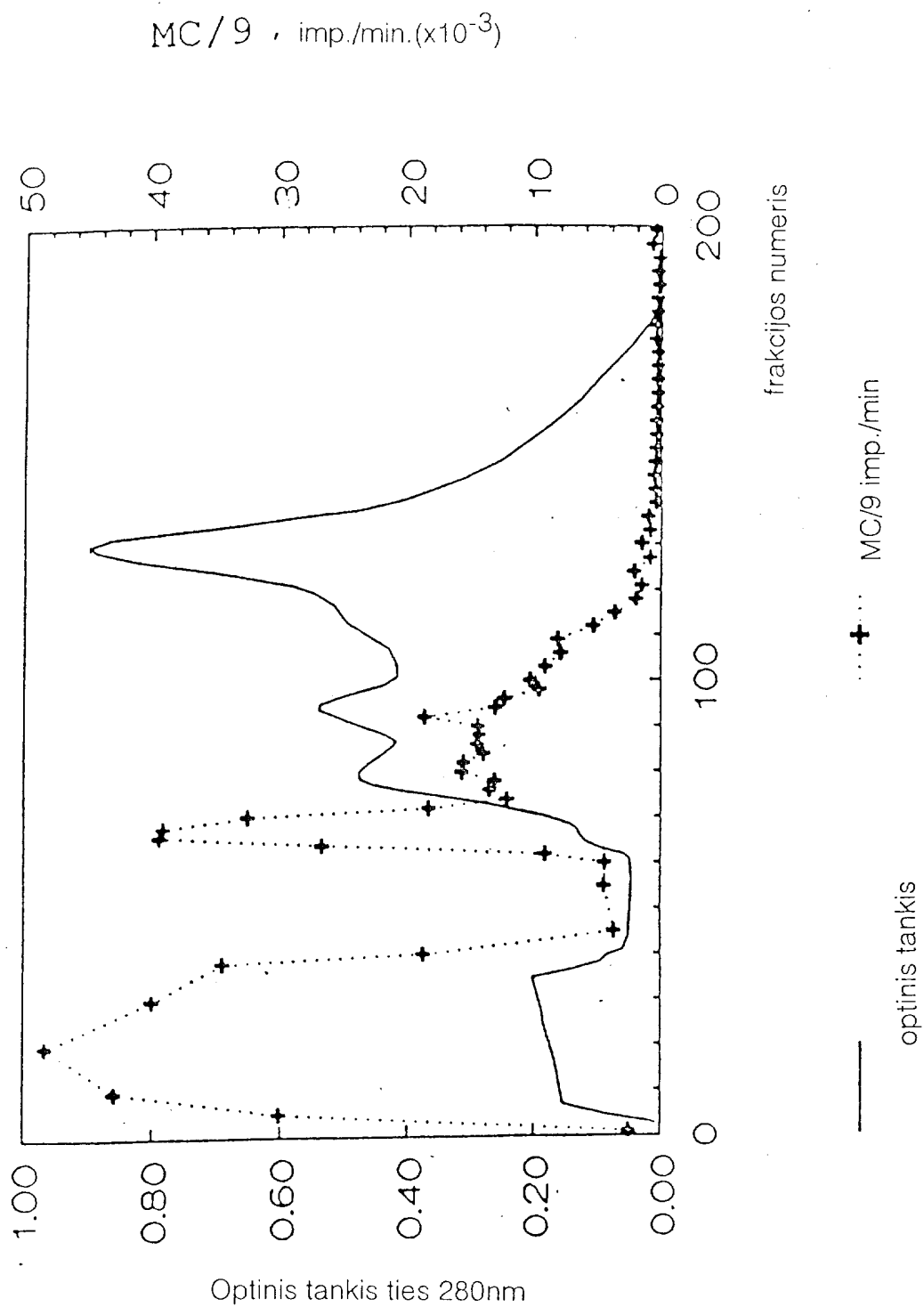


Fig.5

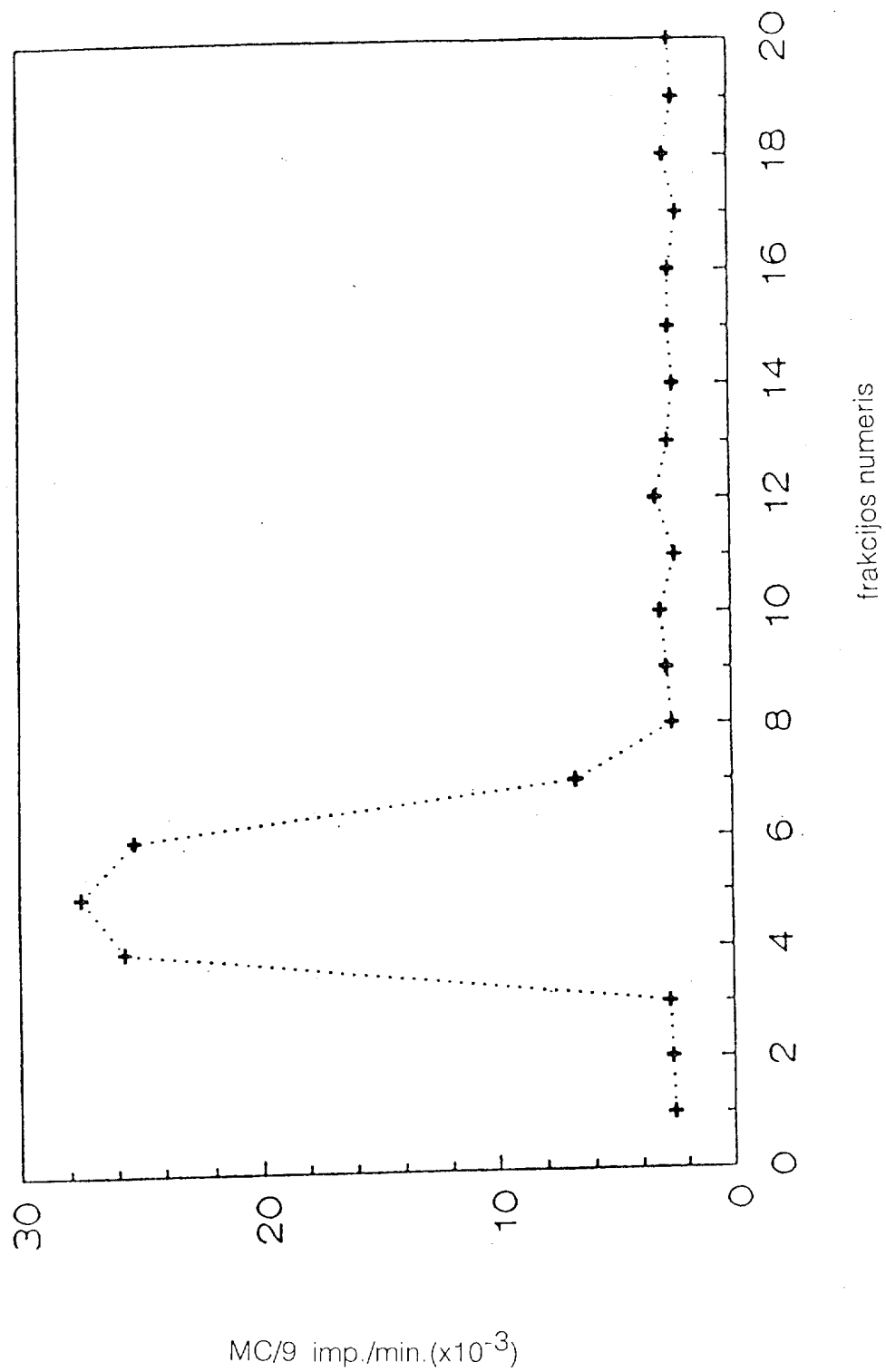


Fig.6

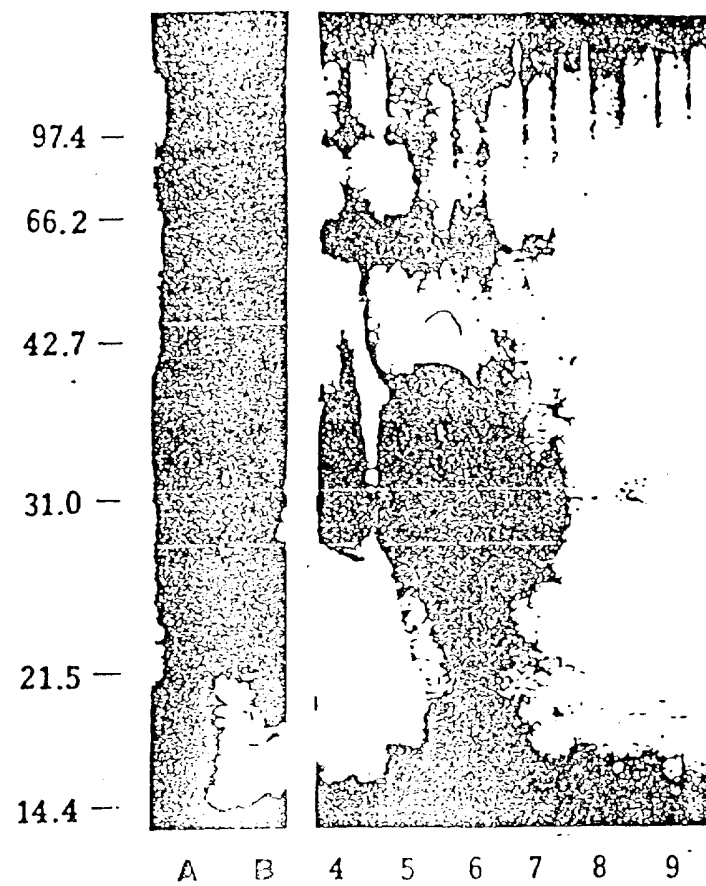


Fig.7

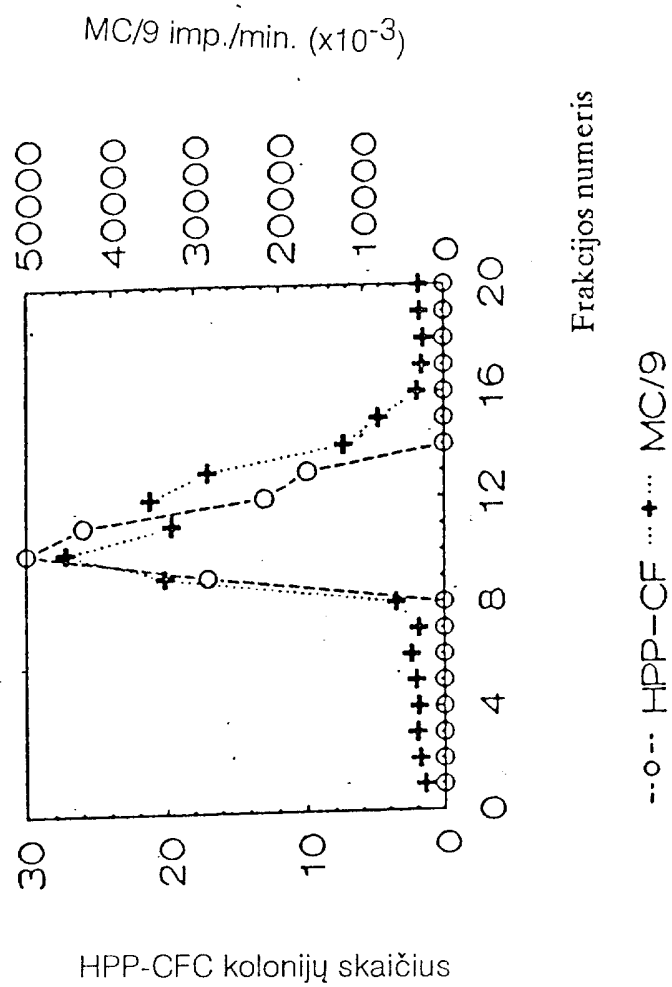


Fig.8

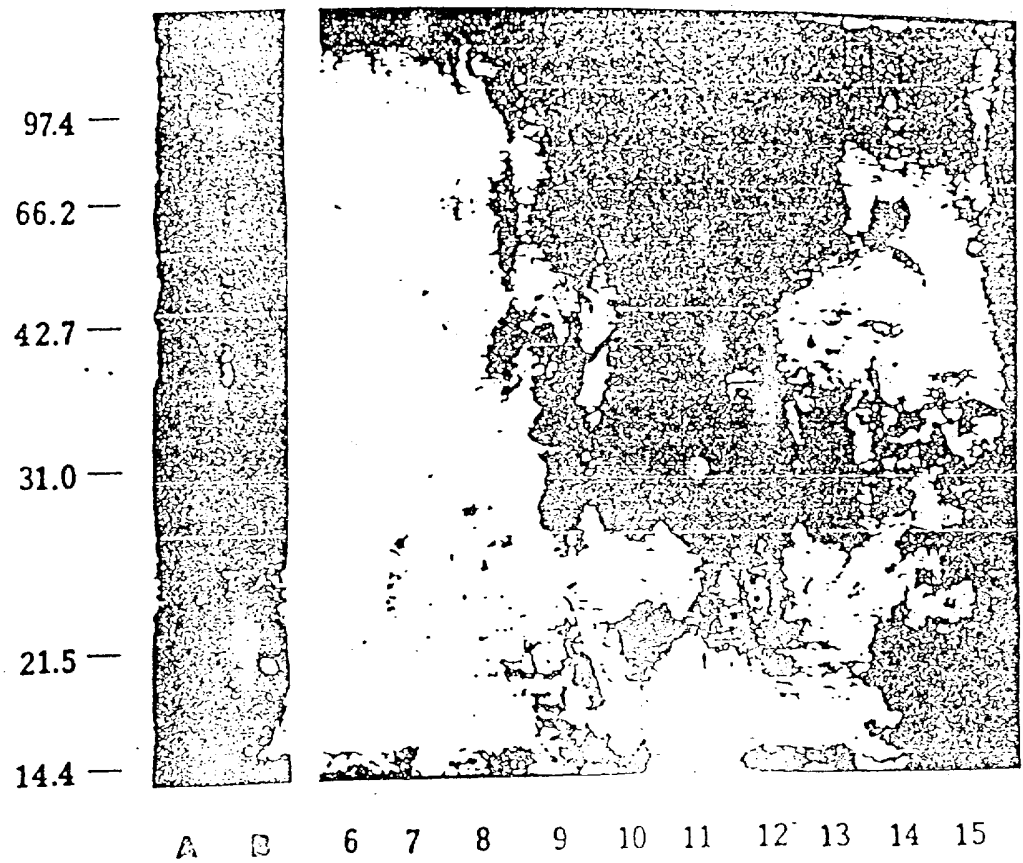


Fig.10

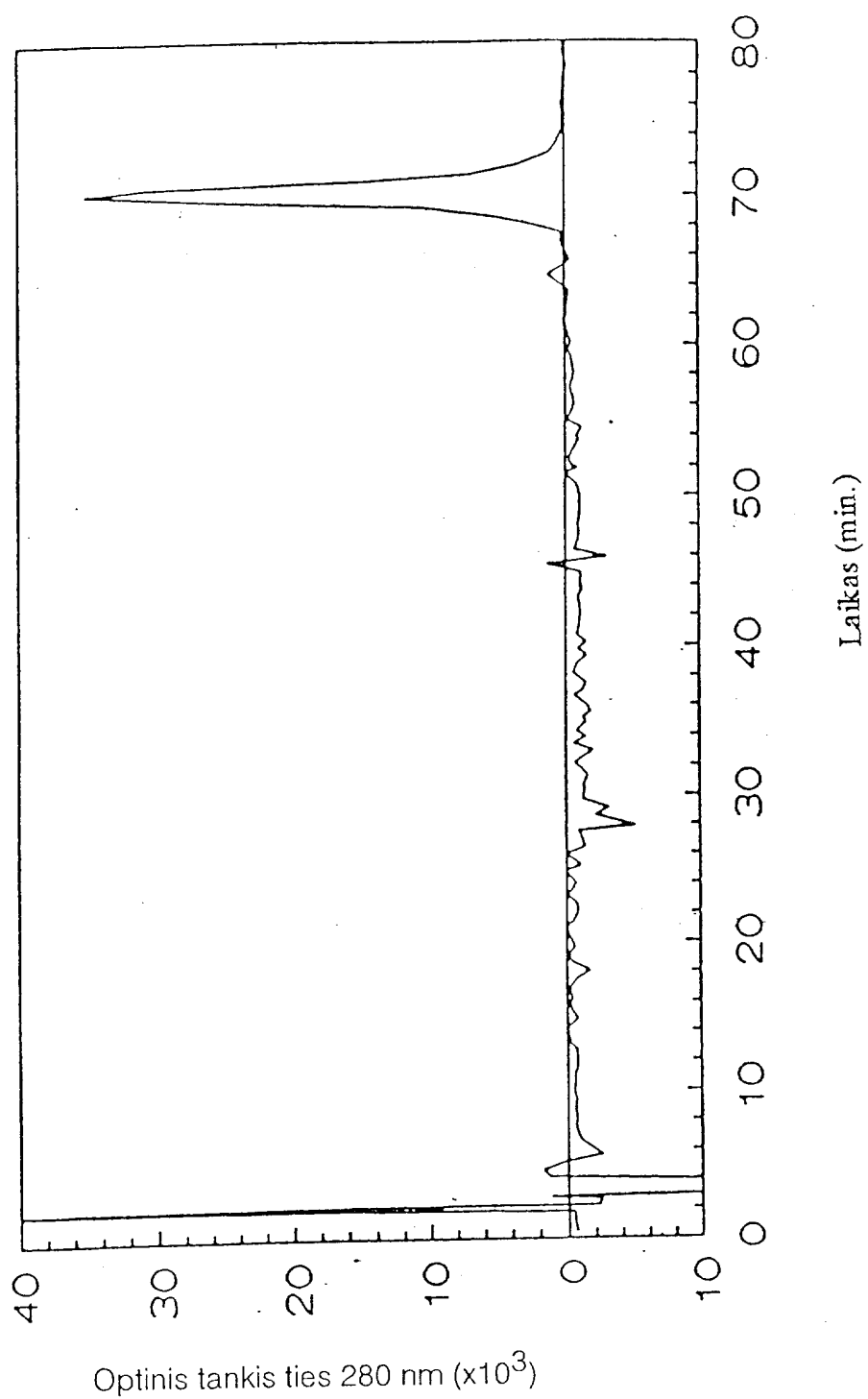


Fig.11

1 10 20
pE E I C R N P V T D N V K D I T K L V A N L P N D
----- Sekų nustatymas po apdorojimo
----- T-5a -----

30 40 50
Y M I T L N Y V A G M D V L P S H C W L R D M V T
<Glu aminopeptidaze
----->
----- T-5a -----

60 70
H L S V S L T T L L D K F S N I S E G L S N Y S I
----- Sekų nustatymas po skaldymo Trp
----->

80 90 100
I D K L G K I V D D L V A C M E E N A P K N V K E
----->
----- T-3 -----

110 120
S L K K P E T R N F T P E E F F S I F N R S I D A
--- T-1 ----- T-4 (N109 negliko) -----
---- T-7 (N120 gliko) ; T-8 (N109 negliko) -----
----- CB-14; CB-15; CB-16 -----
----- S-5 or S-6 (N109 negliko) -----

130 140 150
F K D F M V A S D T S D C V L S S T L G P E K D S
----- T-5b -----
----- CB-6B -----

160
R V S V T K P F M L P P V A (A)
----- T-2 ----- Karboksipeptidaze
----- CB-6B -----
----- S-2 -----

Fig.12a

Oligo	Seka	Issidestynas
219-21	ACATTCCTTIGGIGCATCTCTCCAT G T G T T	393-368
219-22	AAAAACTCCTCIGGIGTAAATT G T T G G	447-425
219-25	GTTTCNGGTTTTT C C C	420-407
219-26	ATGGAAGAAAACGCCCCCAAAACGT G G T G T	368-393
222-11	CCNAATGATTATGATAAC C C C C T	167-186
222-12	GGNGNACATAAANGCCTT G G T	566-585
223-6	ACCATAAATCTTTAAICGATC G G C G G	492-470
224-24	GTAATTTCAATAGATCCATTGA	450-471
224-25	CCAACATATGTCGCC	190-202
224-27	GTAGTCAAGCTGACTGATAAG	273-253

Fig. 12a (tęsinys)

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

Fig.12b

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

Fig.12c

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

Fig.13a

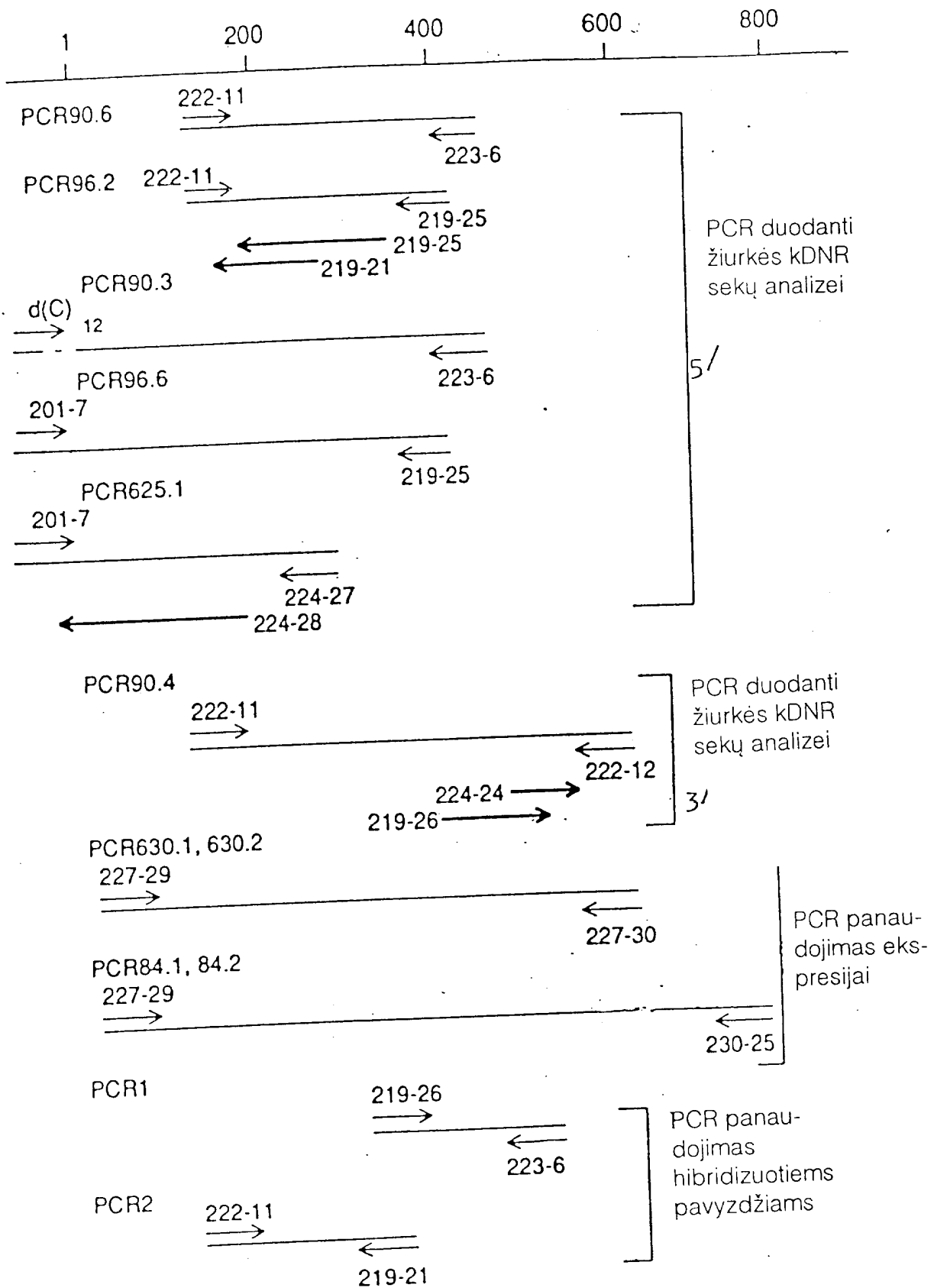
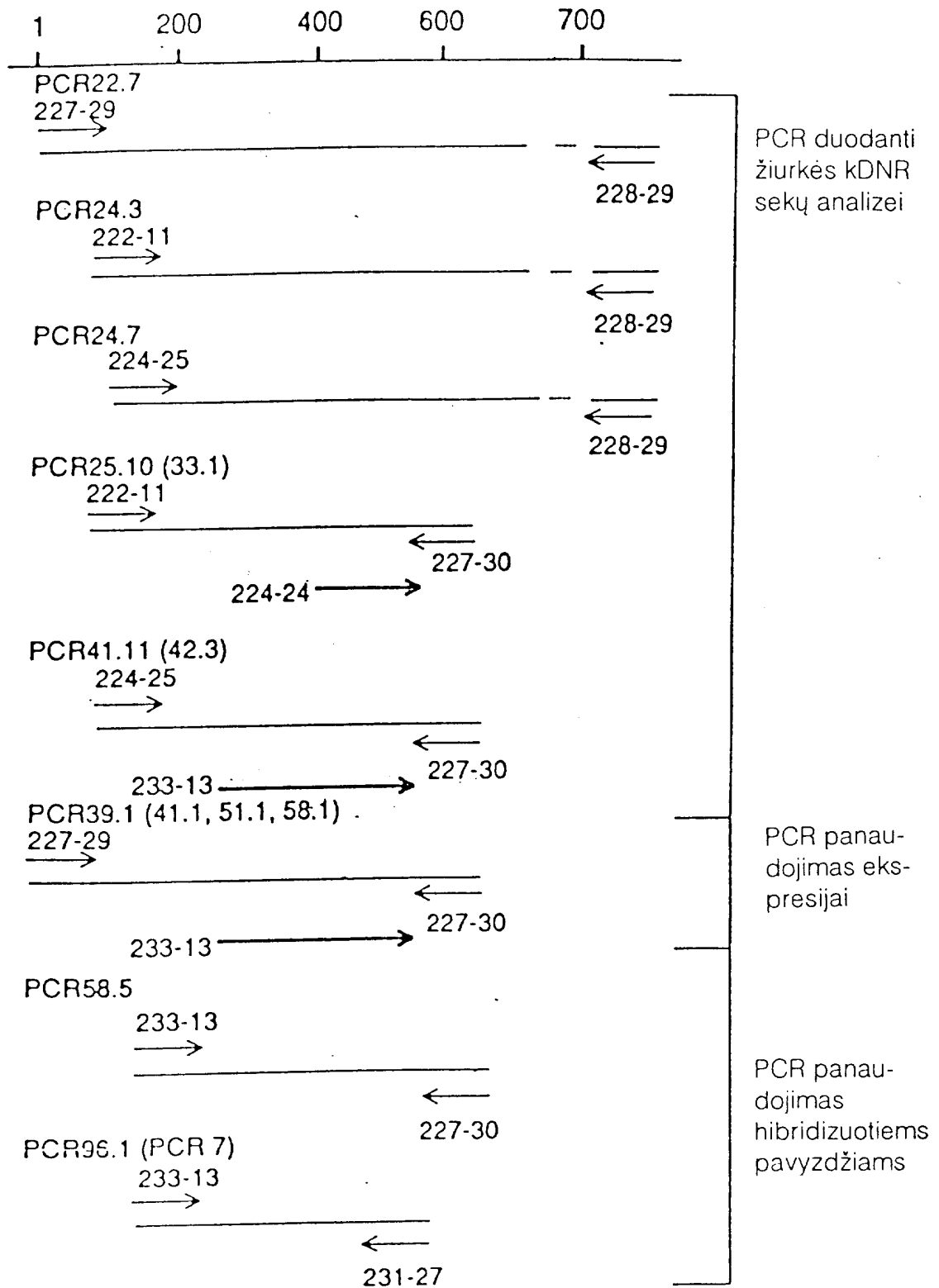


Fig.13b



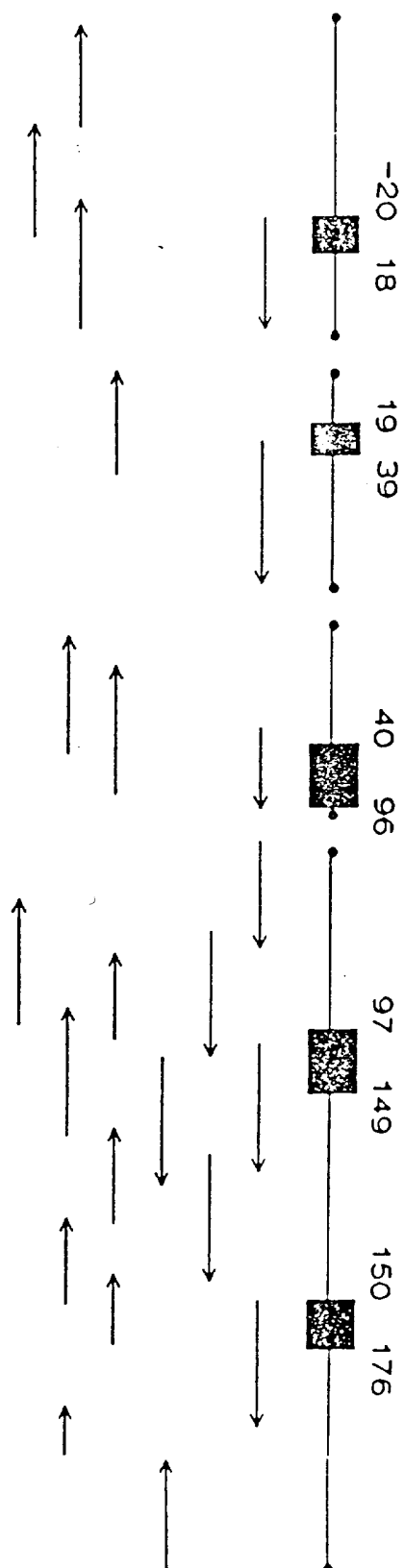


Fig.14a

LT 4019 B

Fig.14b

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

Fig.14b(ţesinys)

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

Isiterpanti seka neţinomo ilgio

TCTCCAGTCCTGGGCATGGTATATACTTAGGCACCCAAGATTGGA	45
TTTACAACCTCAAGCATTATATATTGGACAACnACGGGGTATGAGA	90
TATTAATGATATGTCAGGTTGGATGGATGAGTTTTCTCAAGAAAT	135
	19
	Val
TCTCTTGTATTTACTCACGTTTTTCATTTCTTGGTCTCTGTAGGTG	180

30

AlaAsnLeuProAsnAspTyrMetIleThrLeuAsnTyrValAla	
GCGAATCTTCCAAATGACTATATGATAACCCTCAACTATGTCGCC	225

39

GlyMetAspValLeu	
GGGATGGATGTTTTGGTATGTAGTCCACACACTTCTGAGTTGCCT	270
TTTAGTAGCTAATGGGTGACCTGTGCTTATTCACATTGAAGACAT	315
TATTTGCTCTTTGTCGTTTTTAGATGTTGACCTATAATTTTTCT	360
TCAAGCTGCTGCTAAGATTATCAGTGAGCATTTTCAGTATGTGTTT	405
TAAGCCTACTCATTAAAAGGAAATGGCTCATCTTAGACGTAGCAA	450

LT 4019 B

Fig.14b(tęsinys)

CCGATGTTAATTTTTCCCCAGGCATCTCTCAGAGGGACTTGAATG	495
TTAAAATCATGTTAAATTTCTCCTTGGCTATGTTATTTCTCATG	540
GCTATGTTATTCCTATTCGTATTTTCATTTAAAGGGACGGAATATT	585
TATTGTATTTCTGAACTTTTTTCAGGCATGCATCCGGGTCTTTGAA	630
TAAAA	635

Isiterpianti seka nežinomo ilgio

CACTAAGACTCCTTCTAGTAATGTTTGTAATCCTGTCTGTATCGA	45
ATGTCTTTGAAAACGCAGTGACTAAGCCATAAATAATCTTCCACA	90
GAACGTCCAGTGGTTCATGAACTTTGTATGTGGGGGTGGGGCAAG	135
AATTGTCTCACTATTGGTCAAGGAAGAGAAGGTAAGGTATGCAAG	180
GGTGGTTTAATCTTCTTCCGTGGAAGGACAAAATCATCTATCATT	225
TCCTCTGATCTCTATGCATTTGTTTGTTTTGAACTGAATCTGACT	270
TGAGCAAGAGTTGGCGTCCTGTGTTCTGAGGAAACTCTTTGTCCT	315
GCAGTCAGTGACTAAAAGTGCTGAGAGATCTGAAGAGCACTCTGA	360
ATCTGCCATATTTTTTAATAGATGCTTTGTCTTCTCTTTGAATTTC	405

40	50	
ProSerHisCysTrpLeuArgAspMetValThrHisLeu		
TTCCAGCCTAGTCATTGTTGGTTACGAGATATGGTAACACACTTA	450	

60	
SerValSerLeuThrThrLeuLeuAspLysPheSerAsnIleSer	
TCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTTCAAATATTTCT	495

70	80
GluGlyLeuSerAsnTyrSerIleIleAspLysLeuGlyLysIle	

Fig.14b(tęsinys)

GAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCATAGACAAACTTGGGAAAATA 540

90

96

ValAspAspLeuValAlaCysMetGluGluAsnAlaProLys
GTGGATGACCTCGTGGCATGTATGGAAGAAAATGCACCTAAGGTA 585

ACTTGGTATTCATCAGAATTATTTTTCTTATACT 619

|siterpianti sęka neįinomo ilgio

GAGCTCATGATGAGCAATTCACAACCACTTGTAATTCCAGCTCCA 45

GAGGACATTATCCCCTCTTTGGATGCCATAGGAATCTGCTCTCAA 90

ATATGTAGATACCACCTCTGCCACCTCAGCACATACATACACATA 135

ATTAAAAAATAGAAACATTAAAGGAGTTCCAATCAATCCTTATTC 180

TTTTCTGTATTTCAGTATGCCCAGATGTAAATTCTAGGAATATGTT 225

TTAAAGGCTAATTCTTATTTTGTAAATAAGCAGCTTTAAAATTCTT 270

AATTGTTTTTTTCGGGTCACCTTTATTGTCCTATTGCCACGACATTG 315

TCCTGTCCCATTGTCTGTTATTCCTTCTGTTTTGTTTATTGTTCC 360

CTAGTTACTTTGATCATGAGATTGACCTGTTACCCGTTGTTATTC 405

TCTGTAGCCATTTTGAGTTGTGTCTATTAGAACAGCTGTAAATT 450

ACTTGAATCATTGAGGACATAGTCAATAATCTATTATGCTGATCC 495

AGTCAAGTCTATGAGTTATTTGAAAAC TAGAATCTTTGTTAATTA 540

97

AsnValLys

TTTGTGTTGCTTGTTTGTTTGTTTATTATTTGTCTAGAAATGTAAAA 585

100

110

GluSerLeuLysLysProGluThrArgAsnPheThrProGluGlu

Fig.14b(ţesinys)

GAATCACTGAAGAAGCCAGAACTAGAACTTTACTCCTGAAGAA	630
120	
PhePheSerIlePheAsnArgSerIleAspAlaPheLysAspPhe TTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCTTCAAGGACTTC	675
130	140
MetValAlaSerAspThrSerAspCysValLeuSerSerThrLeu ATGGTGGCATCTGACACTAGTGATTGTGTGCTCTCTTCAACATTA	720
148	
GlyProGluLysA GGTCCTGAGAAAGGTAAGGCTTTTAAGCATTCTTGTTTAAATGT	765
ACATAGAAAGCCTGAACTTCTGTAAGCCTCTACTGCTGAATCAAC	810
TAAATGTGTTGCTGTAGAAAGAACGTGTGGGTTTTTCTGATAAAA	855
ACAAAAAGCAAATATCAATGACTACCAATGATTATTATCTAGCTT	900
GAGAGATATGCCCTAAGACAGCGATTCTCGATATTTCTAAATTAA	945
AGAATTGTGTGATGGTGGCTCACATATTTTCTAACTGTGATATTT	990
GCCAGGAGAGTAGAATAATGTTATTCTTCATCCCCAGAATTCCTA	1035
AGATTTACGTCTCATGTCTTTTCCATAAGGTTCAAACCTCTGAGA	1080
CTTGAGTTCTGAGCCTCAGCAGGTCATTCTGAATCCCCACTCTCC	1125
CCGAGCTGGGTCCCTATGGGGGAACATACTTCATTGCTTTCTTTT	1170
AAAACATGACGAGTTACCAACAGCTCCTCGCTATTATAAACATGT	1215
TCCTAAGCATGTCTGTGCATGCATAAGCCTTCACTCTACAAGAC	1260
AGTTATGGTGTATCGCTTGACAAAACCTGAGCAGCCAAGCTGAGTA	1305
TGAAATAATAATCTAGACTTGGGAGGCAGACCCAGCACCTACTGT	1350
GATATTGCACTTCGCCTTTGGGGGACTCTATGATTCAAAGTTCA	1395

Fig.14b(tęsinys)

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

Fig.14b(tęsinys)

AACTTGACCTGGACCTTAAATAAAGCTATATTTAGTCTTTTTATC	2250
CCTGAAAAATATATTTACAGTG TAGACATTTGATATACATCTAA	2295
GGGAAGGATGCTGCCAGAATGCTCGGGCTGGCAGTCTACAAAGTC	2340
CACTGCTCTCAGGATGGACTTCTGAAAGCGGAAATTGTGAACTGC	2385
ATGCATATAACATATCAGATCCTCGAGC	2413

Fig. 14C

		-25	-20	
CTGGATCGCAGCGCTGCCCTTCCCTTATGAAGAAGACACAACCTGGATTATCACTTGCA		M K K T Q T W I I T C I		60
	-10		1	
Y L Q L L L F N P L V K T Q E I C R N P				
TTATCTCAACTGCTCCTCTATTTAATCCTCTCGTCAAACCTCAGAGATCTGCAGGAATCC				120
	10		20	
V T D N V K D I T K L V A N L P N D Y M				
TGTGACTGATAATGTA AAAAGACATTACA AA ACTGGTGCGAATCTTCCAATGACTATAT				180
	30		40	
I T L N Y V A G M D V L P S H C W L R D				
GATAACCCTCAACTATGTGCGCGGATGATGTTTGCCTAGTCATTGTTGGTTACGAGA				240
	50		60	
M V T H L S V S L T T L L D K F S N I S				
TATG GTAACACACTTATTCAGTCAGCTTGACTACTCTTCTGGACAAGTTTCAAAATATTC				300
	70		80	
E G L S N Y S I I D K L G K I V D D L V				
TGAAGCCTTGAGTAATTATTC CATCATAGACAAACTTGGGAAAATAGTGGATGACCCTCGT				360
	90		100	
A C M E E N A P K N V K E S L K K P E T				
GGCATGTATGGAAGAAAAATGCACCTAAGAA TGTA AAAAGAA TCAC TGAAGAAGCCAGAAAC				420

Fig.14c(tęsinys)

```

110      120
R N F T P E E F S I F N R S I D A F K
TAGAACTTTACTCCTGAAGAATTCTTTAGTATTTTCAATAGATCCATTGATGCCTTCAA 480

130      140
D F M V A S D T S D C V L S S T L G P E
GGACTTCATGGTGGCATCTGACACTAGTGTGCTCTCTTCAACATTAGGTCCTGA 540

150      160
K D S R V S V T K P F M L P P V A A S S
GAAAGATTCAGAGTCAGTGTCAACAAACCATTATGTTACCCCTGTTGCAGCCAGTTC 600

170      180
L R N D S S S S N S K Y T Y L I Y C M H
CCTTAGGAATGACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACACATACTGATTACTGCATGCA 660

190      193
G S K Y P L
TGGCTCCAAGTATCCTCTATAGGAGTGTGTCATGGACTTAAAGTT 705

```

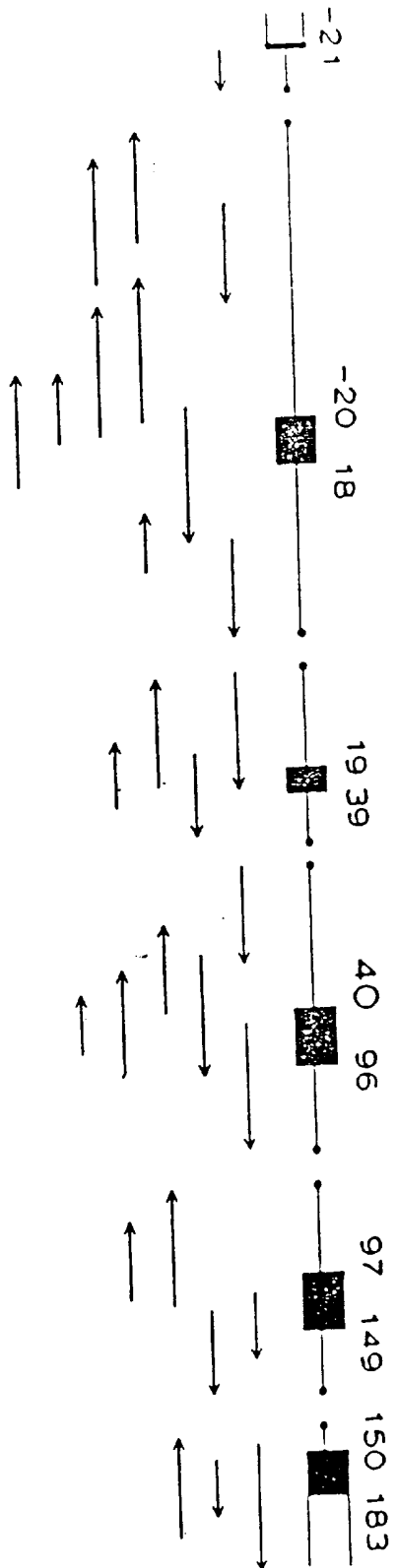


Fig.15a

Fig.15b

-21
hrGln

CACAAGTGAGTAGGGCGCGCCCGGGAGCTCCCAGGCTCTCCAGGA	45
AAAATCGCGCCCGGTGCCCGGGGaaAGCCGGCGCTCCCTGGGACT	90
TGCAGCTGGGGCGTGCAGGGCTGTGCCTGCCGGGTG	126

[siterpanti seka nežinomo ilgio

AGATACTACAAAGATAAATCAGTTGCACAAGTTCTTGAAACTCTA	45
CAGTGTAATAAGGAAAAATAAGTCATGCATAAAAGCAACTATAAT	90
ACATAATAGAAAATGTTATTTTCAAGCCGATGTGTAGGTTATGTG	135
TGTTTCGAGAGAGAGAGAGAGAAGACAGATTACTTTCTGCTAGGGT	180
TCAAGAATGCCTTCCTGTTGGCTAAGGAAATATTTTCCTTAAGTG	225
GCTAAAAAGCTGTGTTTCAAAATATTCTTTTGATGTCTCACAAAT	270
TCAGTGGAATTCTCTTAGGTCTAAAAATATACATCTCTCTCACTT	315
TAACTTGGTGTGCTATTGTAGATTATTGGATTAAAGCACTGCTCA	360
GGGATTATGCTGCTTCTTGCCAAGCAGTCTACATTTAAAGTAGAA	405
ATAAGATGTTTCTTTTGGTGCCATAAGGTATACATTTTATGCATT	450
CTCTAGTTTTTTAGAAGATACCCTAAGGGCTAAGTCTTTAACATGC	495
TGCTACAAGTTTATTCCTAATTGCCATTGGGAAATTGGCTGAAGA	540
AAGTTTTTAACAAAAGTTAACAATATTGTCATTGAGAGAATAATT	585
CAAAATGGATTTTAACTAAAAGCTTTTAAAAAATTGTTGGTGAGCAT	630
AGCTTGAATGCGTAATATTTAATTGCATTTAAGCCAATAACATAT	675

Fig.15b(tęsinys)

ATTAGACTGGTCTTTTTGTGCATCAAGGCATTAGATGTTAAAAGT	720
TTGAATGATTACAGATCTTAAGTATGATCACCAAGCAATTTTTC	765
-20 ThrTrpIleLeuThrCysIleTyrLeuGlnLe -10	
TGTTTTTCATTTAGACTTGGATTCTCACTTGCATTTATCTTCAGCT	810
1 uLeuLeuPheAsnProLeuValLysThrGluGlyIleCysArgAs	
GCTCCTATTTAATCCTCTCGTCAAACTGAAGGGATCTGCAGGAA	855
10 nArgValThrAsnAsnValLysAspValThrLysLeu 18	
TCGTGTGACTAATAATGTAAAAGACGTCACTAAATTGGTAAGTAA	900
GGAATGCTTTACCGTGCTGTGTAAAAAAGAGCTGTGGCTCTTTTT	945
CCTGTGCTTGTTGATAAAAGATTTAGATTTTTCTTGCCCCAAAGT	990
AATGTTTTCTTAAAGTGGGGAAAGTAATCACTGGGTACATAAAA	1035
GGGTTTATAGAAAGCAGGTAGTGAGATATTTAGGGTCATGGATAA	1080
TTTGTTGGTAAAACTGGCTAGTTGCACACCACTGCTGTGACTGCT	1125
TCTTTGCTGGTCTTCTCCCCATCCTTCATAGGCAGTGAAGGACCT	1170
TGGAGAGTTCGCTGTGTGCTGATGGGCTTGCCCCAGCTTGTTCCC	1215
CATAATCTCTCCAGTGGGTTTCCCAGCATGTTCTATTCCCCTTCA	1260
CATGTCTTCCTACTCTTCTTTAAAAAGCCTAACGAAAGGAAATCT	1305
GAAATGGCTATTCTCCCAATTCAATCAGCAGGAAGACCCTGTCAC	1350
ATGTCAGTGGGTGTTTGCTCCTTCAGGGAACATAGAGAGGTGATT	1395
CATTGCCACATGTTGAAGGGACTCATCTCCCTGGTTTGTCACAT	1440
TGAACTCTTCCCTCAGCGAAAGCATTTGCATTGCTTCCC	1479

Fig.15b(tęsinys)

|siterpianti seka nežinomo ilgio

GAATTCCAAGATCACAGGTGGAAGCTGAAATTCAGATCATGTTTC	45
CAAACTCAGTAGGTTATACCTAGCCAGGCATAACTGAATTTGGA	90
GTCTAAAAGATCTGTATTATCACTTTTTTTATTTTGAAGGATGCCT	135
TTTGATTACAGAGGGAAATCAAGGATTAAAAATCAATATACATGT	180
AAATATTGAAATTCATTGGTAACTTTAAAAAGCACACAGTTTTG	225
TGTGCTTTTCTCCAAAGCACTACAAATATGATTAATTGATGTATA	270
	19
	ValAlaA
AGAATTTTCTTATGGAATTTTTTTTTTTTGTCTCTGTAGGTGGCAA	315
	30
snLeuProLysAspTyrMetIleThrLeuLysTyrValProGlyM	
ATCTTCCAAAAGACTACATGATAACCCTCAAATATGTCCCCGGGA	360
	39
etAspValLeu	
TGGATGTTTTGGTATGTAAACTACATTTCTGAGTTTCATTTTAGT	405
AGCTCATAGAAGAAATGGGATCATTCATATTGAGATAGTACACTA	450
GCTGCTATTTAGGAGCTTGCTTATTGTCAGGATTGAAGAATTTA	495
TCTTTGGAATTTGACTTGCAGGCTTTTTTTTCCCCCTCTT	535

|siterpianti seka nežinomo ilgio

CCTGTTACAAGAGTCCCTCCTCCTATTACAATAGTCCCTCCTCCT	45
CCTGTCACACTAGTCCCTTCTCTTCCTGTTACAATAACCCCTGTC	90

Fig. 15b(tęsinys)

CTCCTATTACAACATTTTAAGTAATGTAATATTAATTTTAAAAAT 135
 CTGGCCAGGCACGGTGGTTCATGCTTGTAATCCCAGCACATTGGG 180
 AAGCTGAGACGGGTGGATCATTTGAGGTCAGGAAGTTTGAGACAG 225
 CCTGGCCAACATGGTGAACTTCCTCTCTACTAAAAATAAAAAAG 270
 TAGCCAGGCATGGTGGCAGGCACTTGTAATCTGAGCTACTCGAGA 315
 GGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAGTAACTAAAACGATAGCTTTG 360
 AAGAGTACTCCGAGTTTTATGGCACTTACTTATTAAAATAGCTGT 405

 40
 ProSerHisCysTrpIleS
 TTTGTCTCTTTTTTCATATCTTGCAGCCAAGTCATTGTTGGATAA 450

 50 60
 erGluMetValValGlnLeuSerAspSerLeuThrAspLeuLeuA
 GCGAGATGGTAGTACAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGG 495

 70
 spLysPheSerAsnIleSerGluGlyLeuSerAsnTyrSerIleI
 ACAAGTTTTCAAATATTTCTGAAGGCTTGAGTAATTATTCCATCA 540

 80 90
 leAspLysLeuValAsnIleValAspAspLeuValGluCysValL
 TAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTGCGTGA 585

 96
 ysGluAsnSerSerLys
 AAGAAAACCTCATCTAAGGTAACCTTGTGTTTCATTGGGATTATTTT 630
 TCATTACGCTTCTCTAAAAACCCATGCTTCTTGGTGCTGTTGGGG 675
 AAAATGAGGCACCTTTATTTATGATATTTTGATTGTATAAACTTC 720
 AAATTTAAAAATCTTGTTTCAGATGAGCAAAGAAAACAAGTATTTG 765
 CAGTTATACTGCAATACTGAAGTGCACATTC 796

Fig.15b(tęsinys)

[siterpanti seka nežinomo ilgio

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

Fig.15b(tęsinys)

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

Fig.15c

-25	-20		
	M K K T Q T W I L T C I Y L Q		61
AAGCTTGCCCTTTCCTTATGAAGAAGACACAAACTTGGATTCTCACTTGCAATTATCTTCAG			
-10	1		
L L L F N P L V K T E G I C R N R V T N		10	
CTGCTCCTATTTAATCCTCTCTCGTCAAAACTGAAGGATCTGCAGGAATCGTGTGACTAAT			121
	20		
N V K D V T K L V A N L P K D Y M I T L		30	
AATGTAAAGACGTCACCTAAATTGGTGGCAAACTCTTCCAAGACTACATGATAACCCCTC			181
	40		
K Y V P G M D V L P S H C W I S E M V V		50	
AAATATGTCCCCGGGATGGATGTTTGGCCAAAGTCATTGTTGGATAAGCGAGATGGTAGTA			241
	60		
Q L S D S L T D L L D K F S N I S E G L		70	
CAATTGTCAGACAGCTTGACTGATCTTCTGGACAAGTTTTCAAAATATTCTGAAGGCTTG			301
	80		
S N Y S I I D K L V N I V D D L V E C V		90	
AGTAATTATTCATCATAGACAAACTTGTGAATATAGTGGATGACCTTGTGGAGTCCGTG			361
	100		
K E N S S K D L K K S F K S P E P R L F		110	
AAAGAAACTCATCTAAGGATCTAAAAAATCATTCAGAGCCCCAGAACCCAGGCTCTTT			421

Fig. 15c((tēsiny's)

T P E E F F R I F N R S I D A F K D F V	120	130	
ACTCCTGAAGAATTCTTTAGAATTTTAATAGATCCATTGATGCCCTTCAAGGACTTTGTA			481
	140	150	
V A S E T S D C V V S S T L S P E K D S			
GTGGCATCTGAACCTAGTGATTGTGTGTTCTTCAACATTAACTCCTGAGAAAGATTCC			541
	160	170	
R V S V T K P F M L P P V A A S S L R N			
AGAGTCAGTGTCACAAACCATTATGTATACCCCTGTGACGCCAGCTCCCTTAGGAAT			601
	180	183	
D S S S S N S K Y I Y L I			
GACAGCAGTAGCAGTAATAGTAAGTACATATATCTGATTTAATGCATGGCTCCAAT			661
TAGCACCTATAGGAGTATTCATGGGCTTCAAGGAACCTTCTACATTTAATTATTATGA			721
TACTGTCTGTACTGTATTTCCTTTTATGGTCTTCTTGAGACTTAACTTTGTAGAATTA			781
AATTTCCTAGAGCTGGAGATAATGTTTAGAGAATTAGG			820

Fig. 16a

-25 1 25
 Žmogaus MKKTQTwILT CIYLQLLFN PLVKTEGICR NRVtNNVKDv TKLVANLPkD
 Bezdžionės MKKTQTwILT CIYLQLLFN PLVKTEGICR NRVtNNVKDv TKLVANLPkD
 Šuns MKKTQTwIIT CIYLQLLFN PLVKTKGICG KRVtDDVKDv TKLVANLPkD
 Pelės MKKTQTwIIT CIYLQLLFN PLVKtKEICG NPvTDNVKDI TKLVANLPND
 Žiurkės MKKTQTwIIT CIYLQLLFN PLVKtQEICR NPvTDNVKDI TKLVANLPND
 Sutarinis MKKTQTwIIT CIYLQLLFN PLVKt.gICr nRVtdnVKDv TKLVANLPkD

75
 Žmogaus YMITLKYVPG MDVLPShCWI SEMVvQLSDS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 Bezdžionės YMITLKYVPG MDVLPShCWI SEMVvQLSDS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 Šuns YKIALKYVPG MDVLPShCWI SVMVEQLSVS LTDLLDKFSN ISEGLSNYSI
 Pelės YMITLNYVAG MDVLPShCWL RDMVIQLSLS LTTLLDKFSN ISEGLSNYSI
 Žiurkės YMITLNYVAG MDVLPShCWL RDMVTHLSVS LTTLLDKFSN ISEGLSNYSI
 Sutarinis YmItLkYVpG MDVLPShCWi s.MVvqLS.S LTdLLDKFSN ISEGLSNYSI

125
 Žmogaus IDKLvNIvDD LVECVKENSS KDLKKSFKSP EPRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 Bezdžionės IDKLvNIvDD LVECVKENSS KDLKKSFKSP EPRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 Šuns IDKLvKIvDD LVECTEGYSF ENVKKAPKSP ELRLFTPEEF FRIFNRSIDA
 Pelės IDKLgKIvDD LVLCMEENAP KNIKESPKRP ETRSFtPEEF FSIFNRSIDA
 Žiurkės IDKLgKIvDD LVACMEENAP KNVKESLKKP ETRNFtPEEF FSIFNRSIDA
 Sutarinis IDKLvKIvDD LveC.eens. kn.Kks.KsP E.RlFTPEEF FRIFNRSIDA

Fig.16b

Žmogaus	FKDF.VVASE	TSDCVVSSSTL	SPEKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	174
Beždžionės	FKDF.AVASE	TSDCVVSSSTL	SPEKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	
Šuns	FKDLETLASK	SSECVVSSSTL	SPDKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	
Pelės	FKDF.MVASD	TSDCVLSSTL	GPEKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	
Žiurkės	FKDF.MVASD	TSDCVLSSTL	GPEKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	
Sutartinis	FKDF.mvAS.	tSdCVvSSSTL	sPeKDSRVSV	TKPFMLPPVA	ASSLRNDSSS	
Žmogaus	SNRKAKNPFG	DSSLHWAAMA	LPALFSLIIG	FAFGALYWKK	RQPSLTRAVE	224
Beždžionės	SN					
Šuns	SNRKASNSIG	DSNLQWAAMA	LPAFFSLVIG	FAFGALYWKK	KQPNL	
Pelės	SN					
Žiurkės	SN					
Sutartinis	SNRKA.N..G	DS.L.WAAMA	LPA.FSL.IG	FAFGALYWKK	.QP.L	
Žmogaus	NIQINEEDNE	ISMLOEKERE	FQEV			248

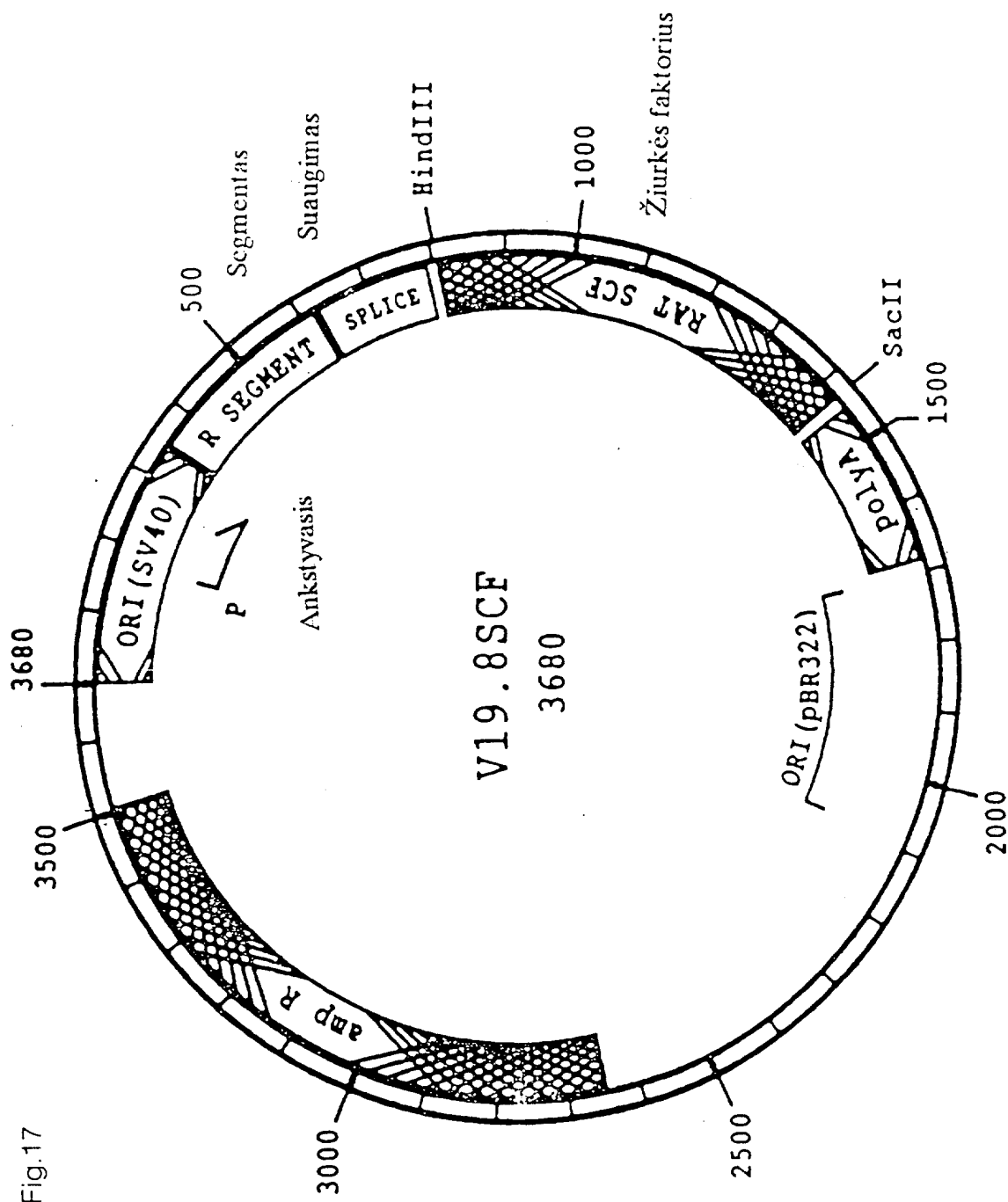
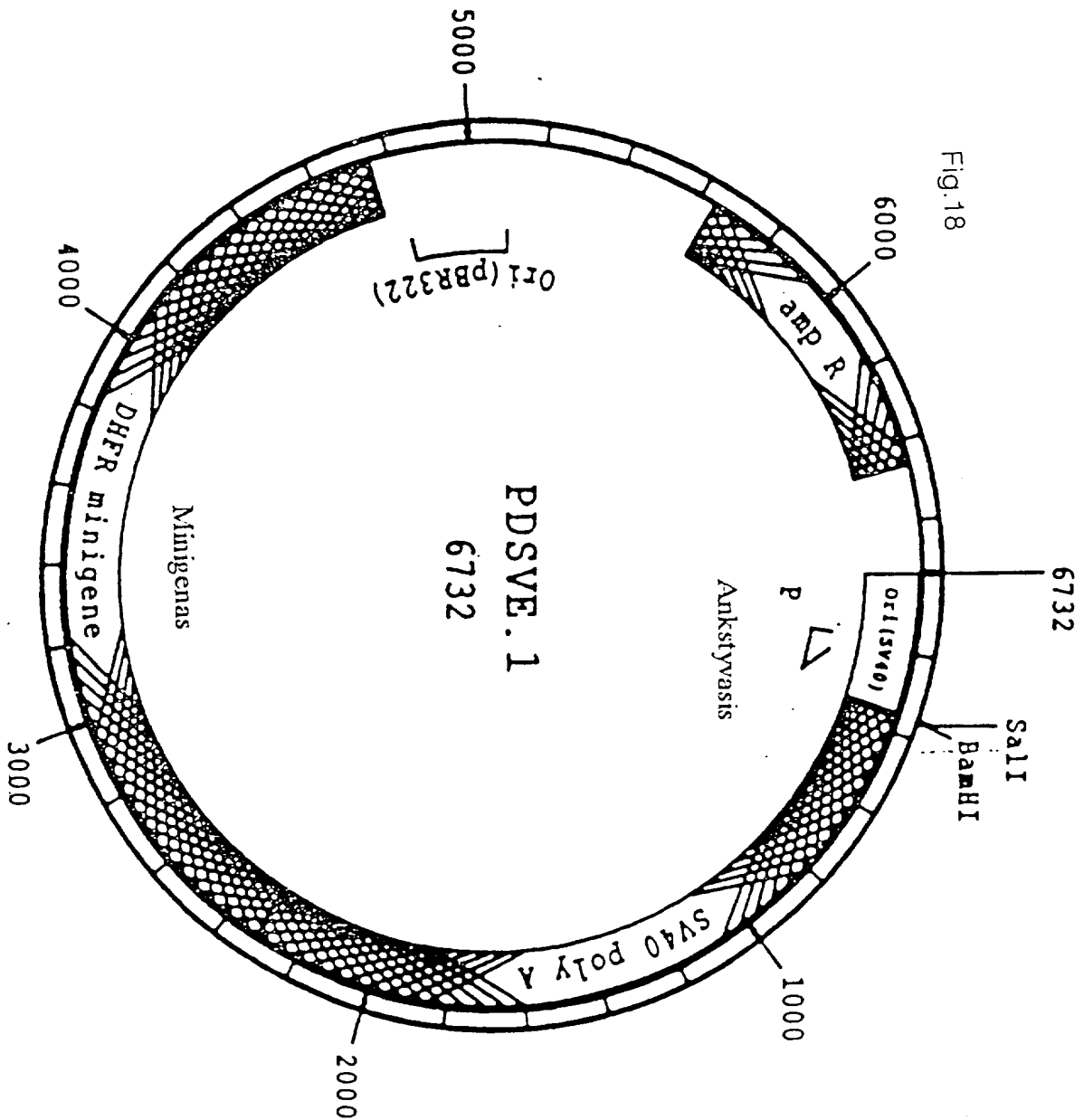


Fig.17

Fig.18



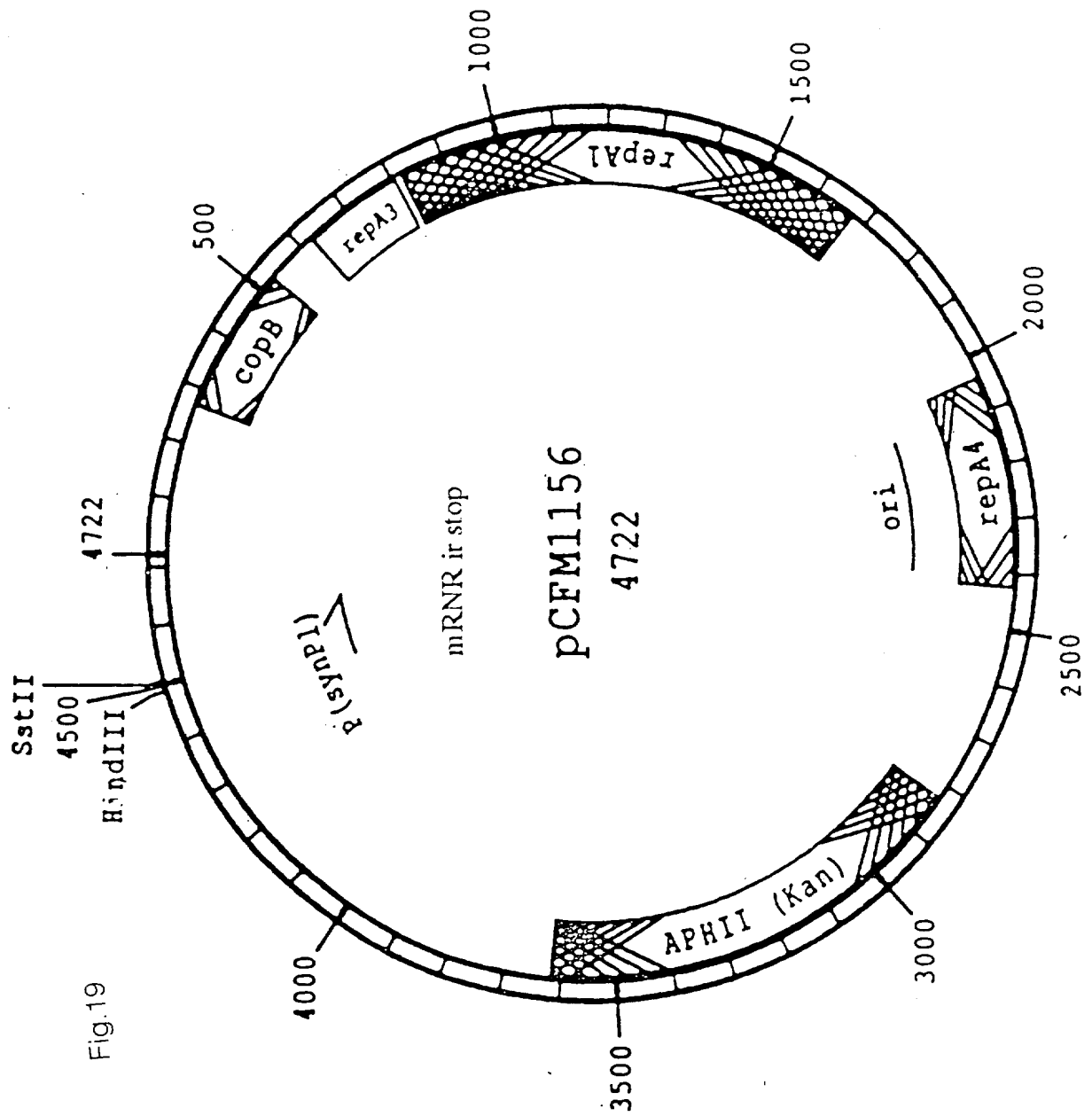


Fig.19

Fig.20a

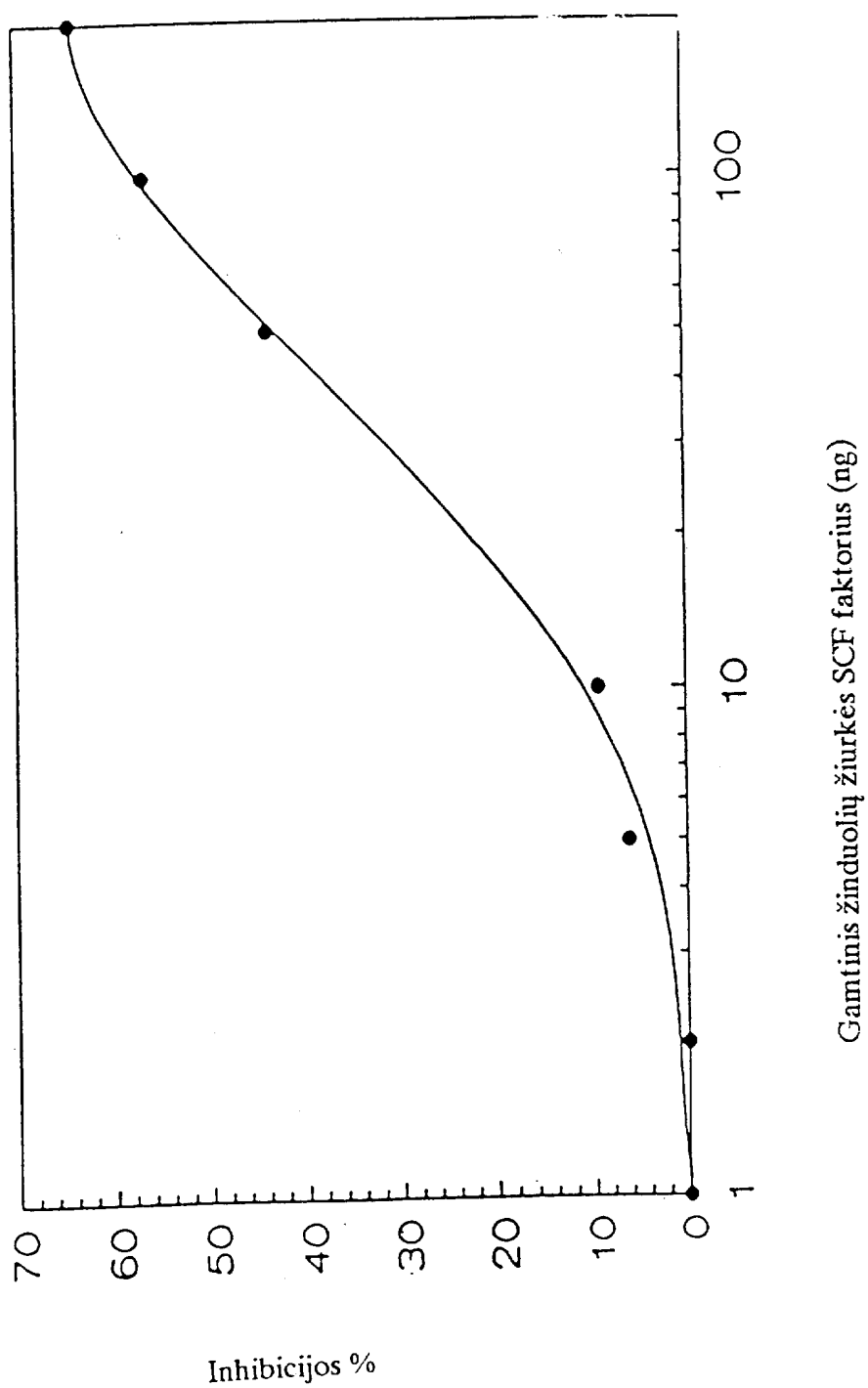


Fig. 20b

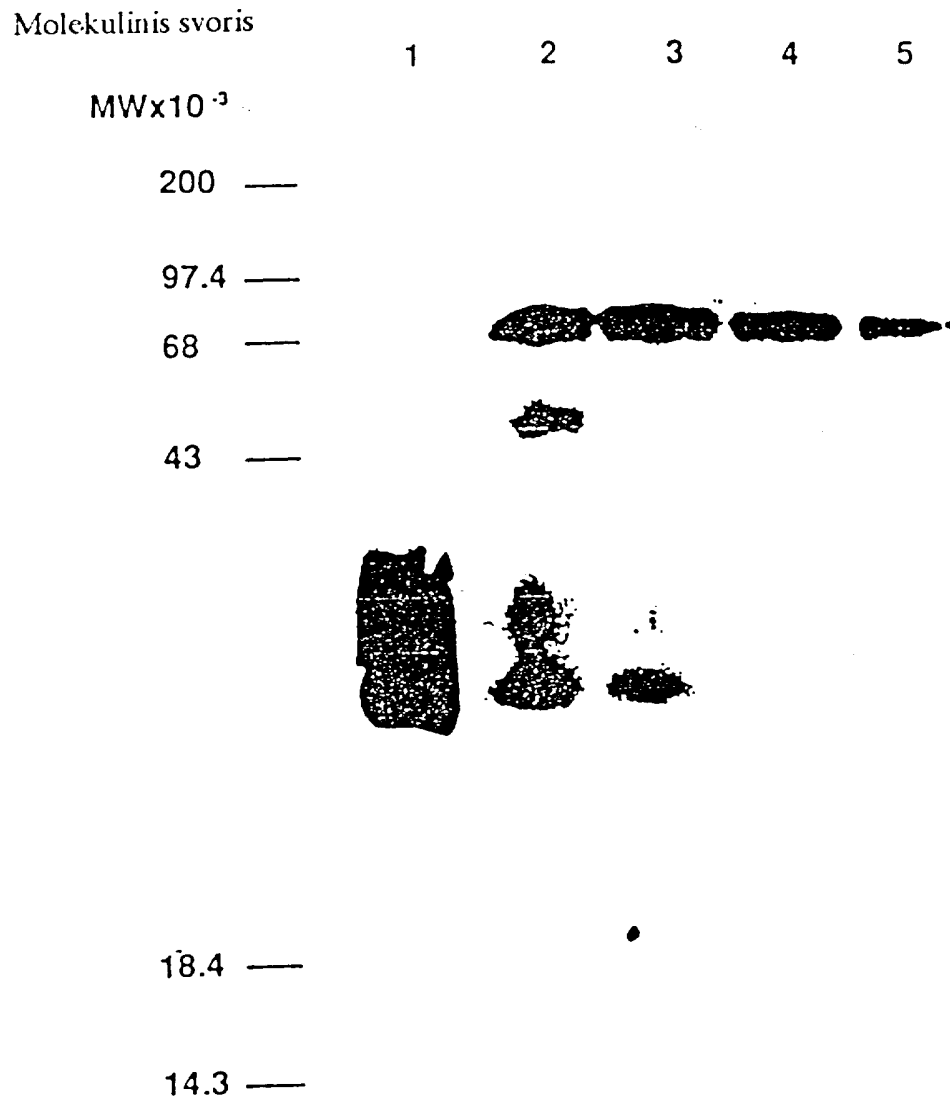


Fig.21

								Molekulinis svoris
1	2	3	4	5	6	7	8	MWx10 ³

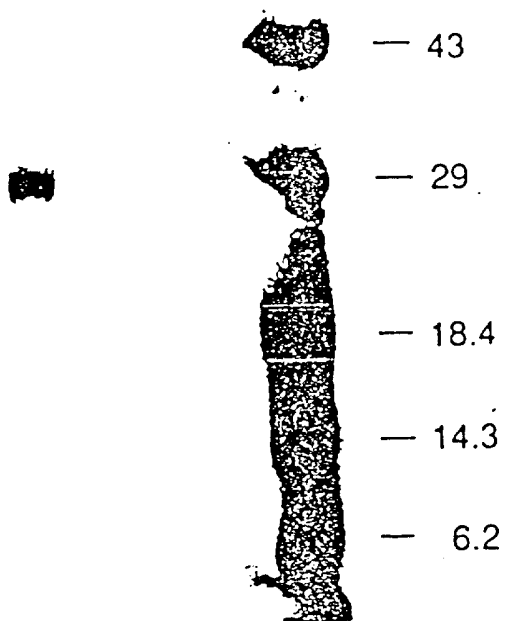


Fig. 22

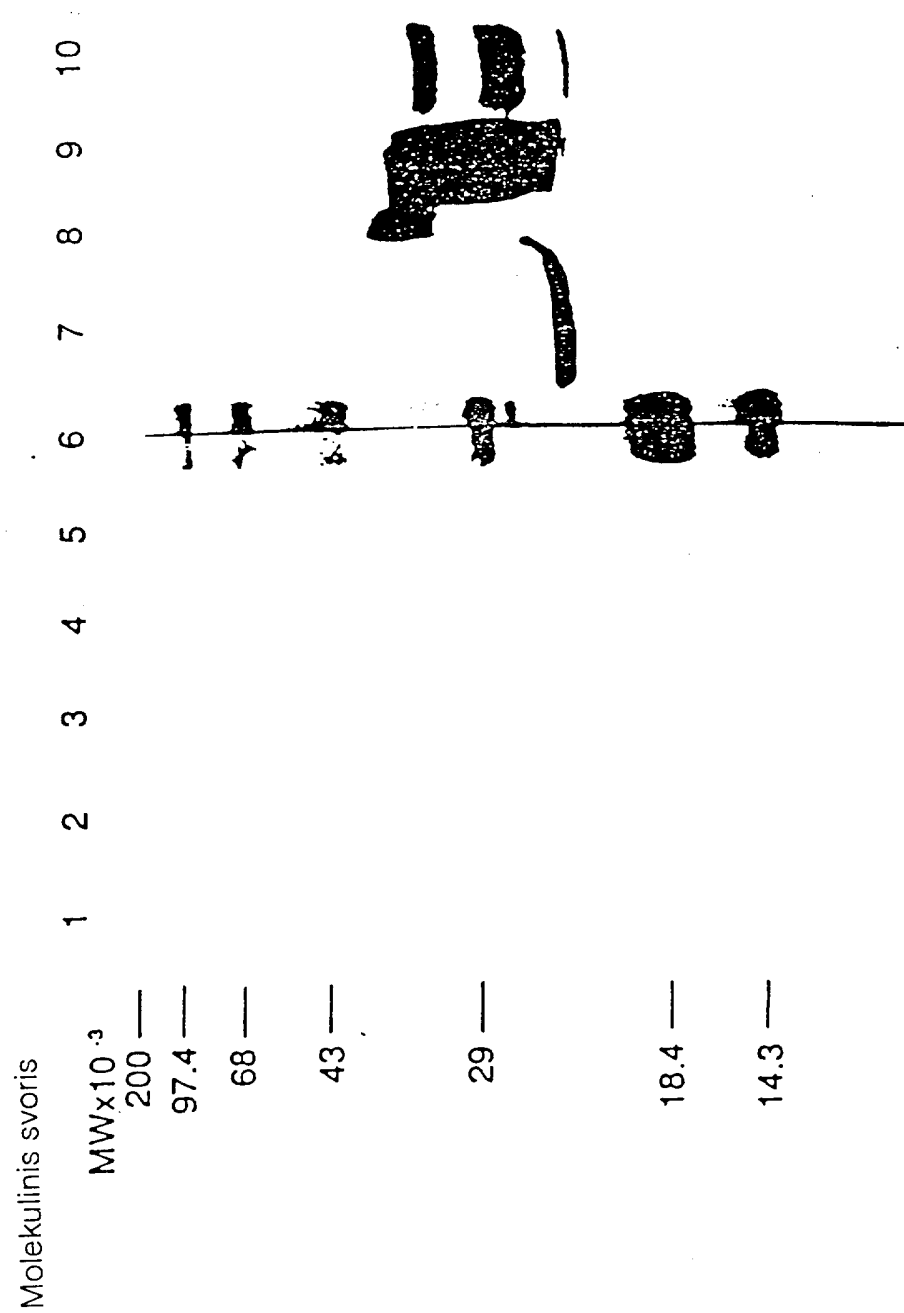


Fig.23

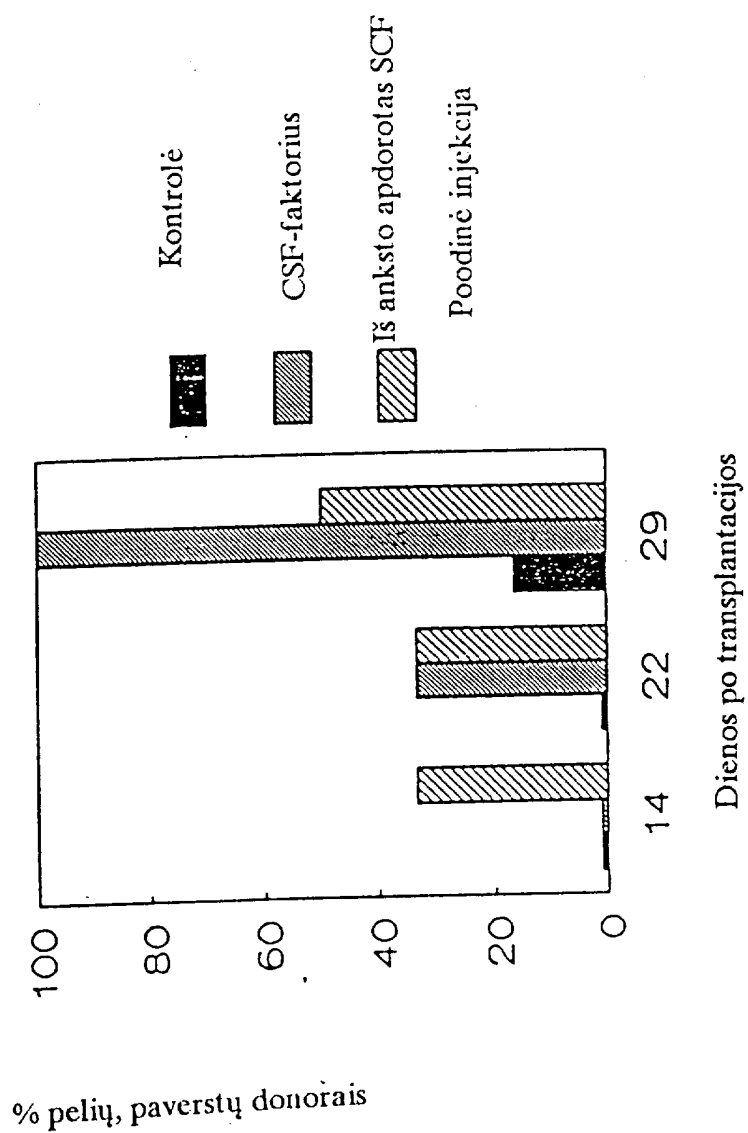


Fig.24a

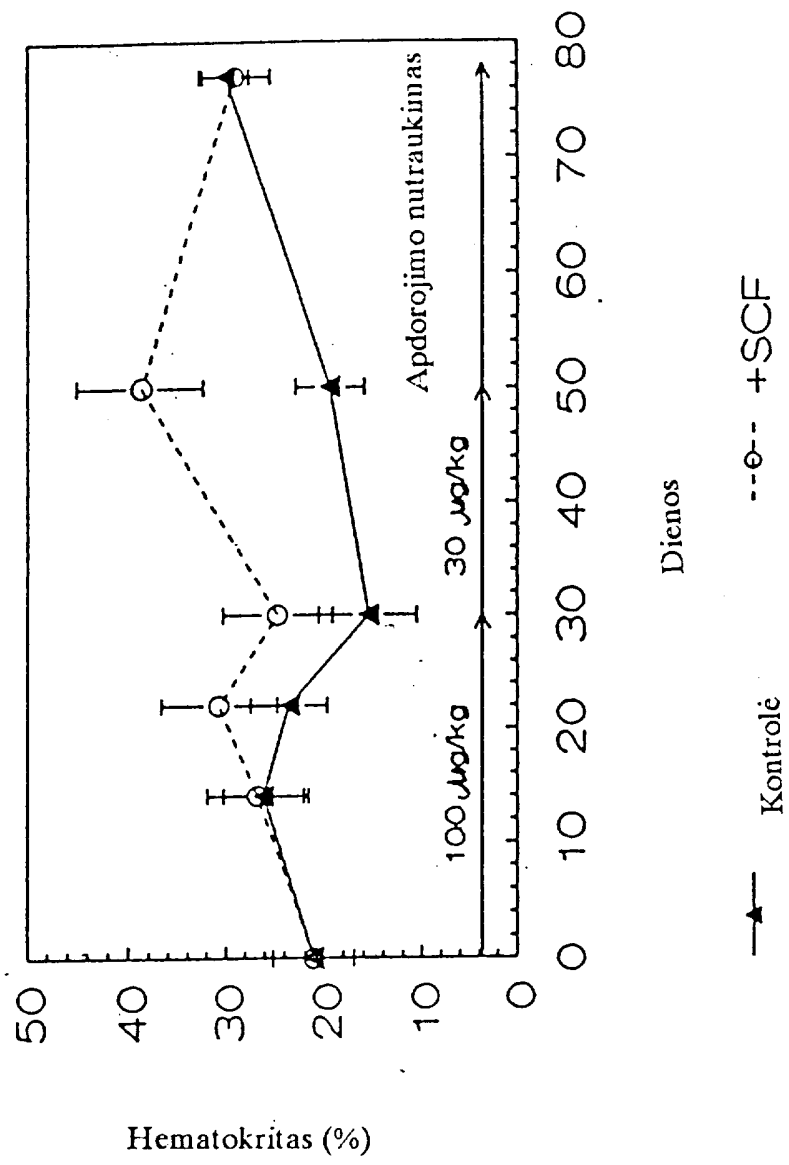


Fig.24b

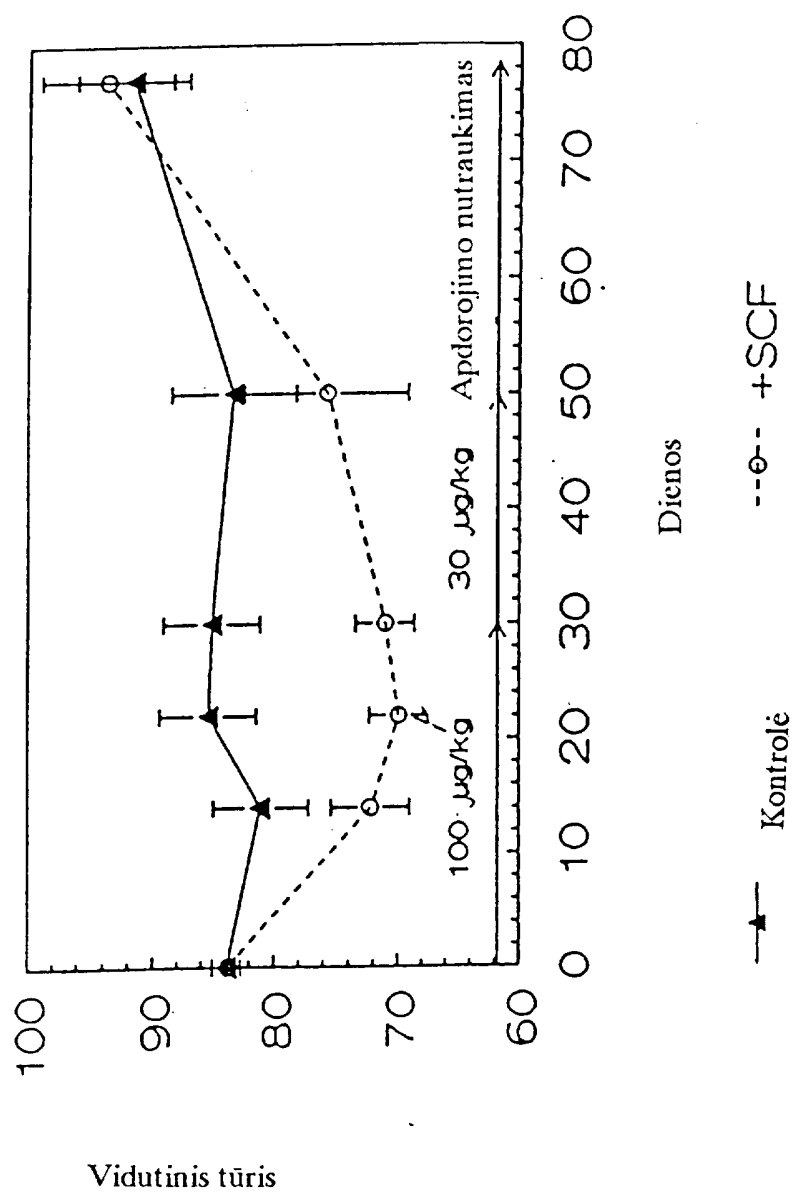


Fig.25

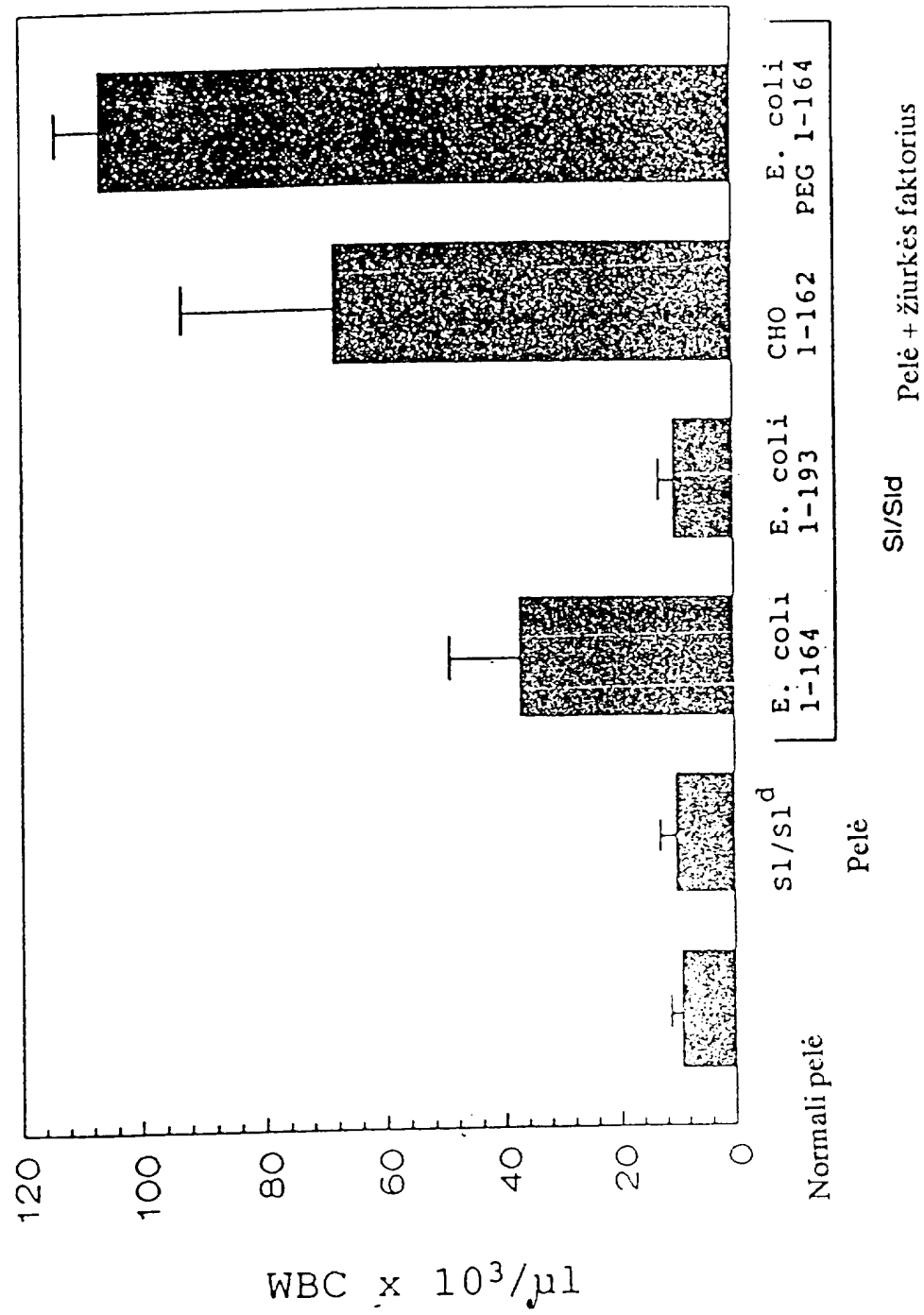


Fig.26

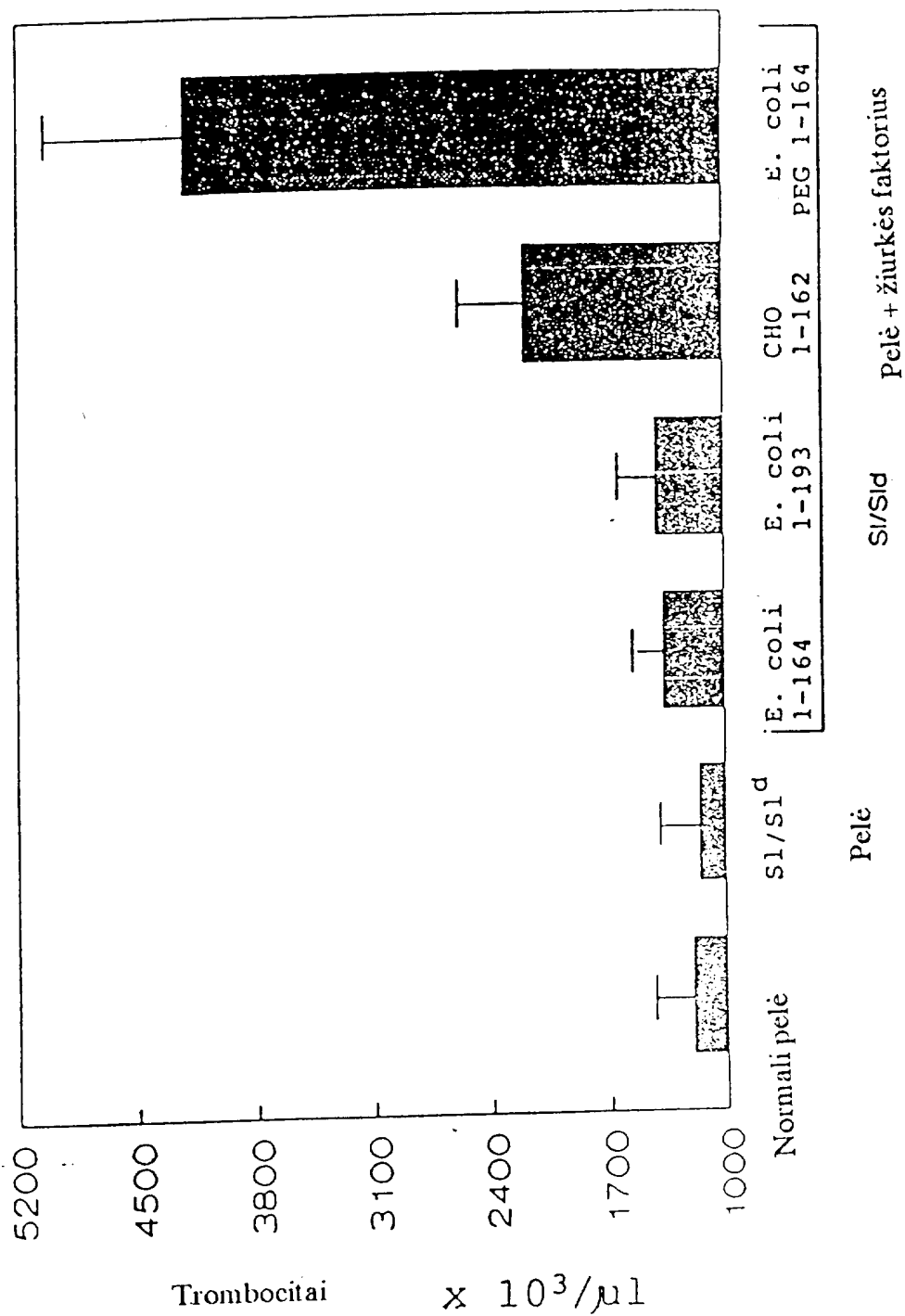


Fig. 27

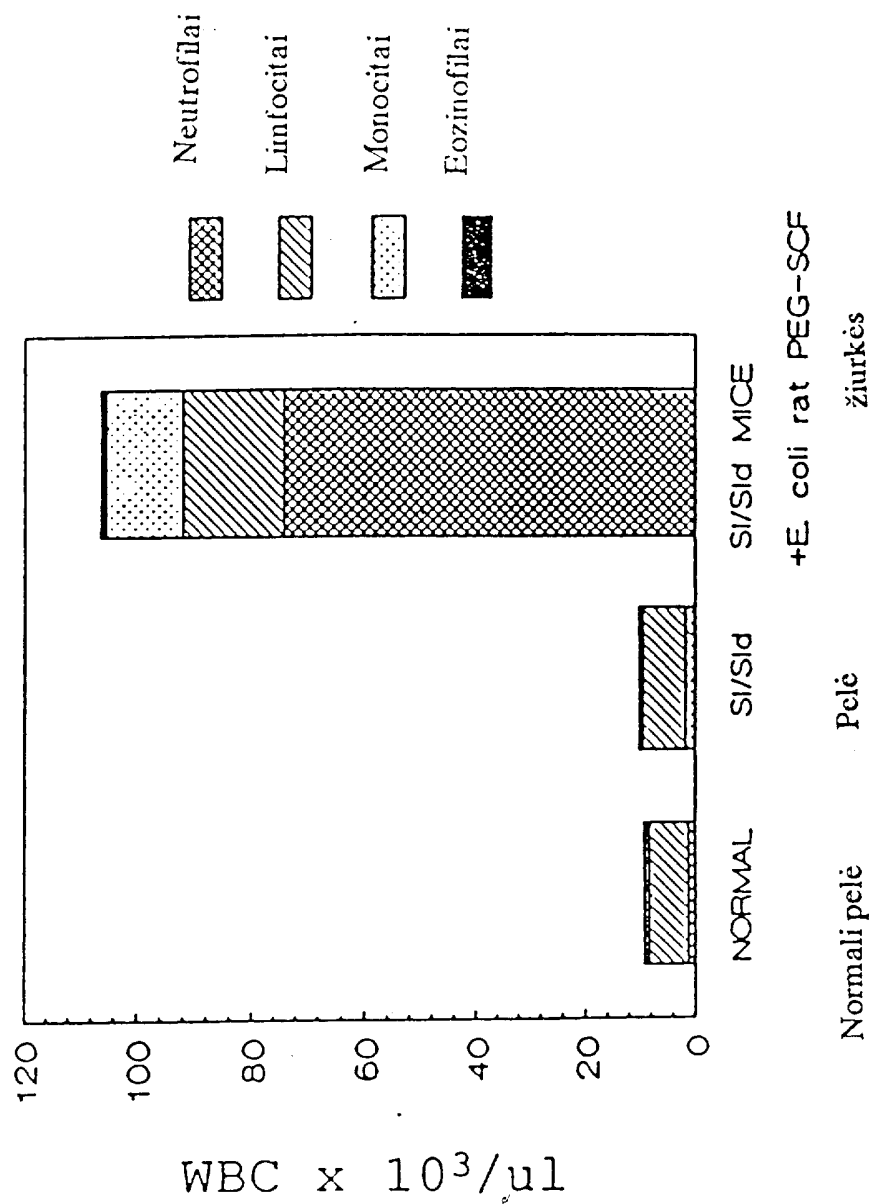


Fig.28

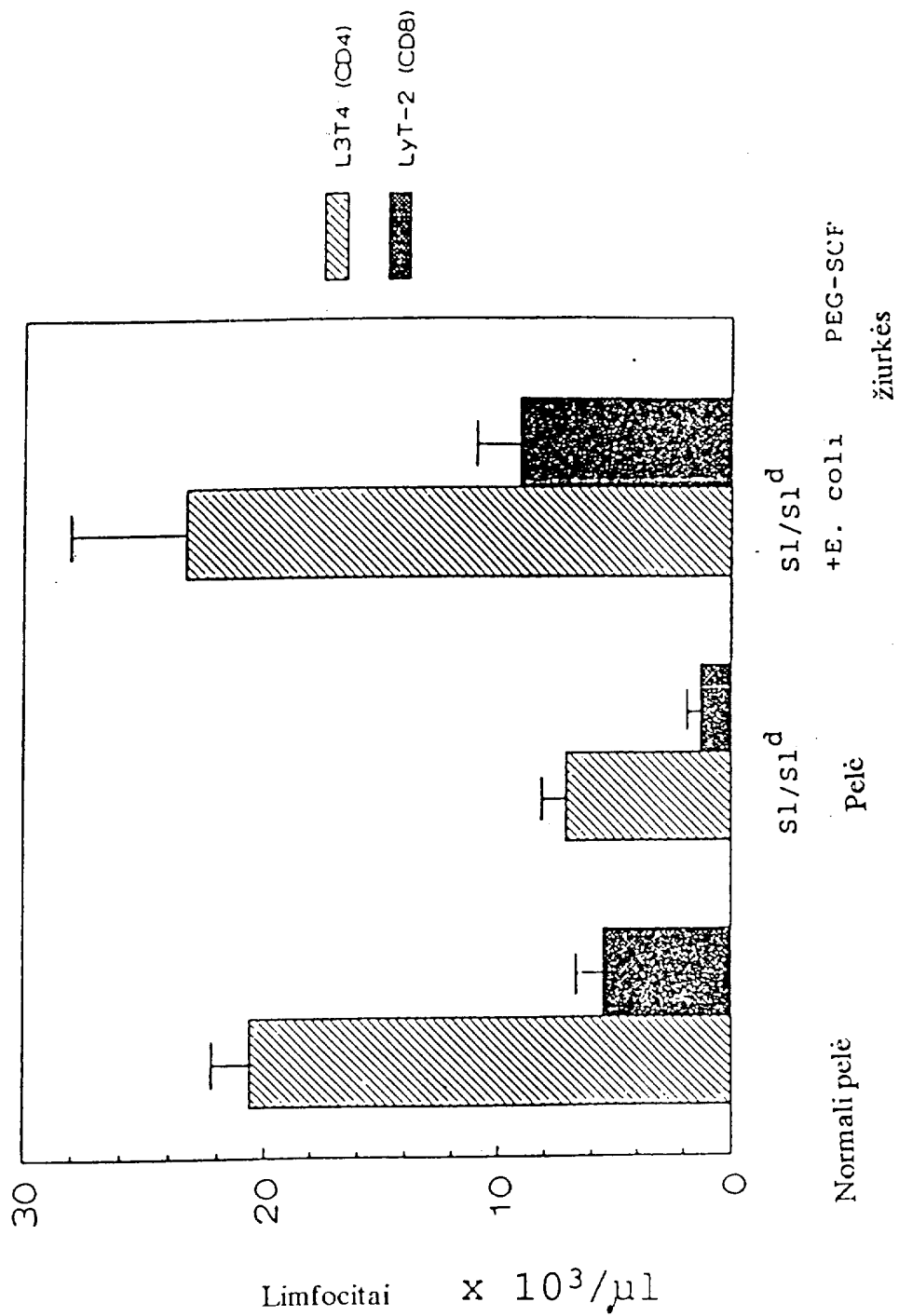


Fig.29a

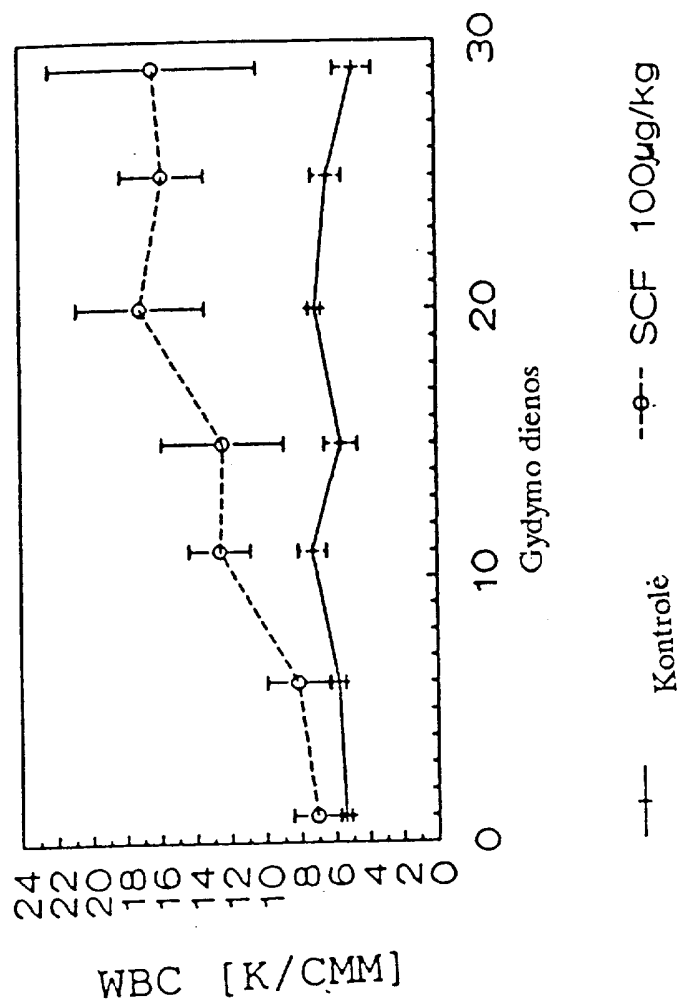


Fig. 29b

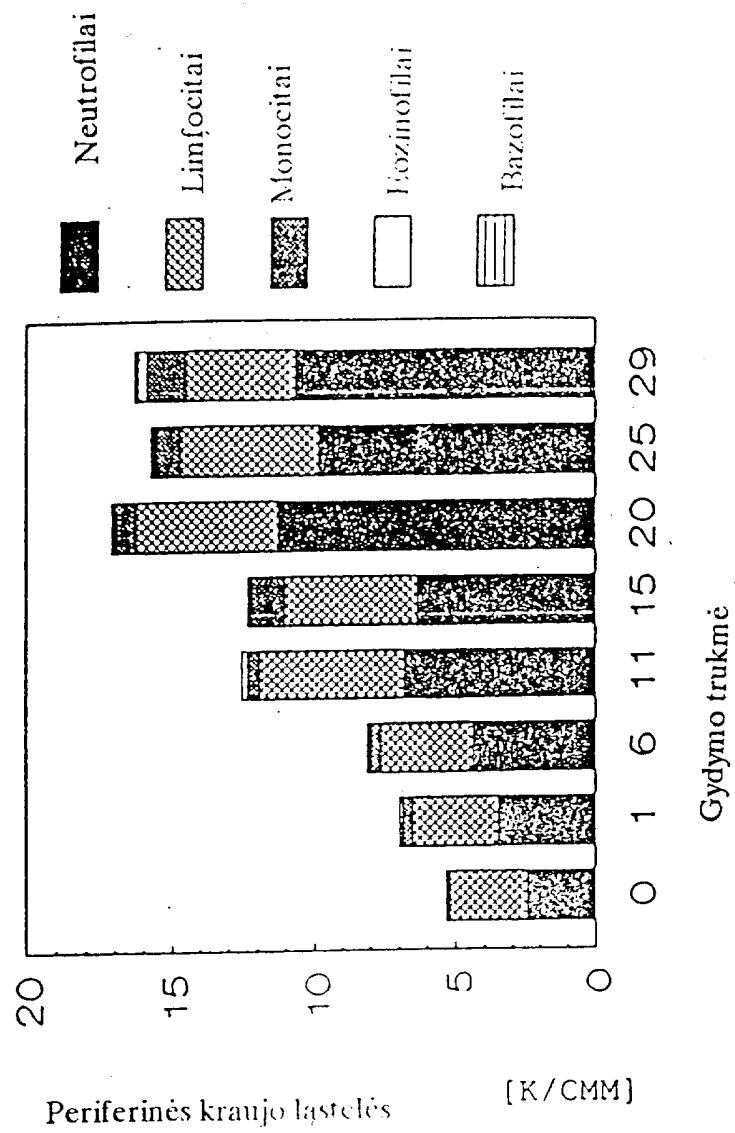


Fig.30a

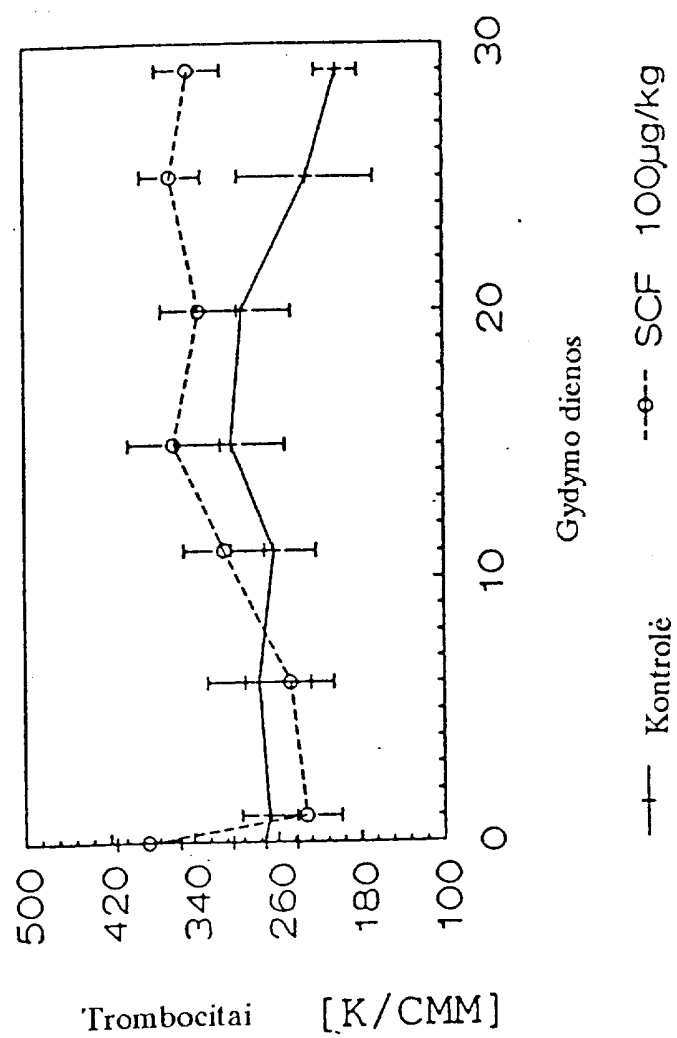


Fig.30b

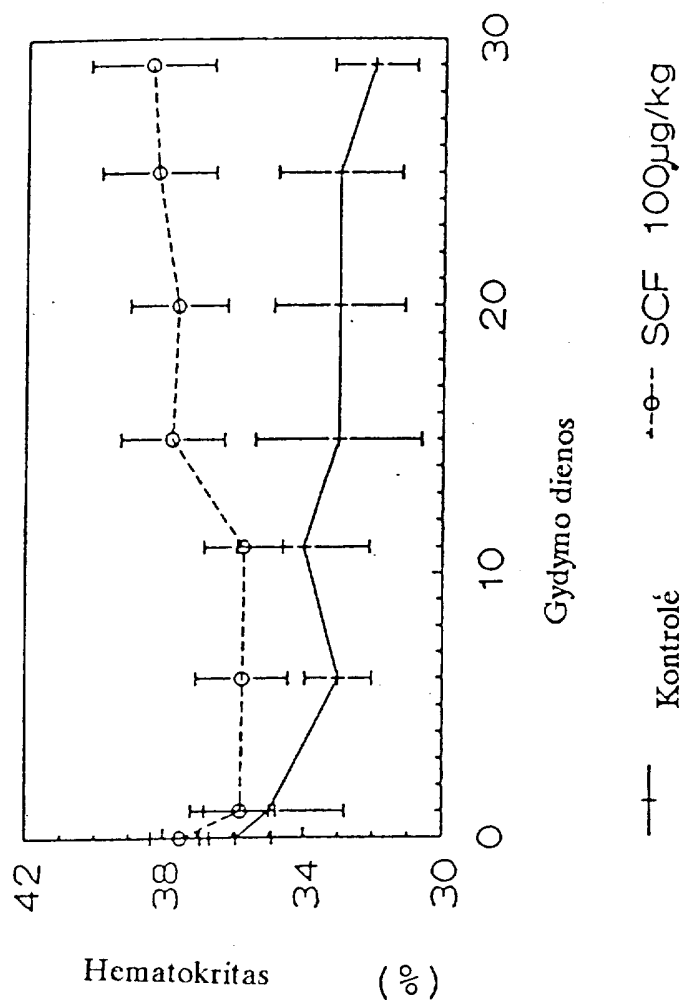


Fig.31b



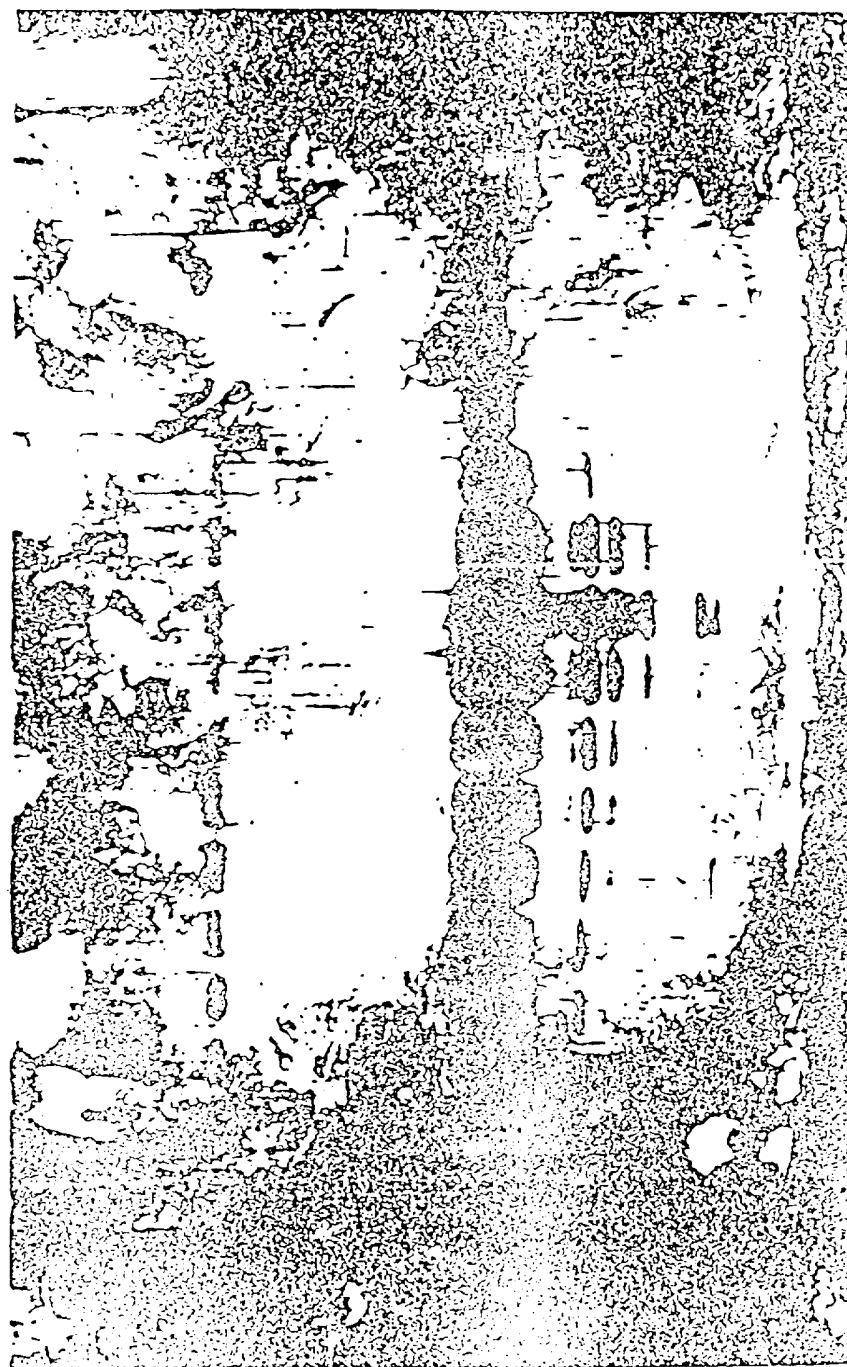
Fig.31a



Fig.32a

Pakrovimas S-sefaroze

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



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

Pakrovimas S-sefaroze

Fig.32b

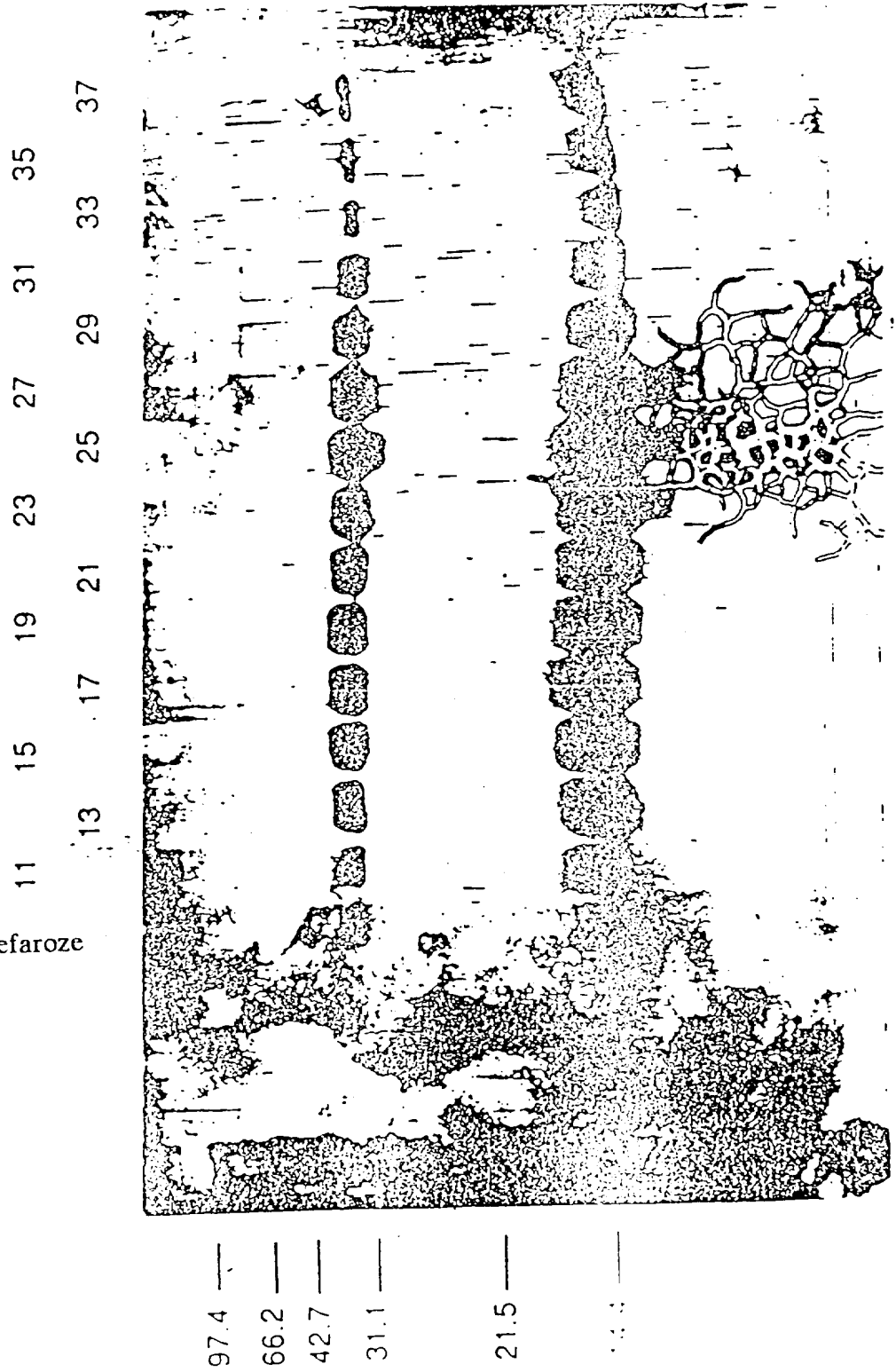
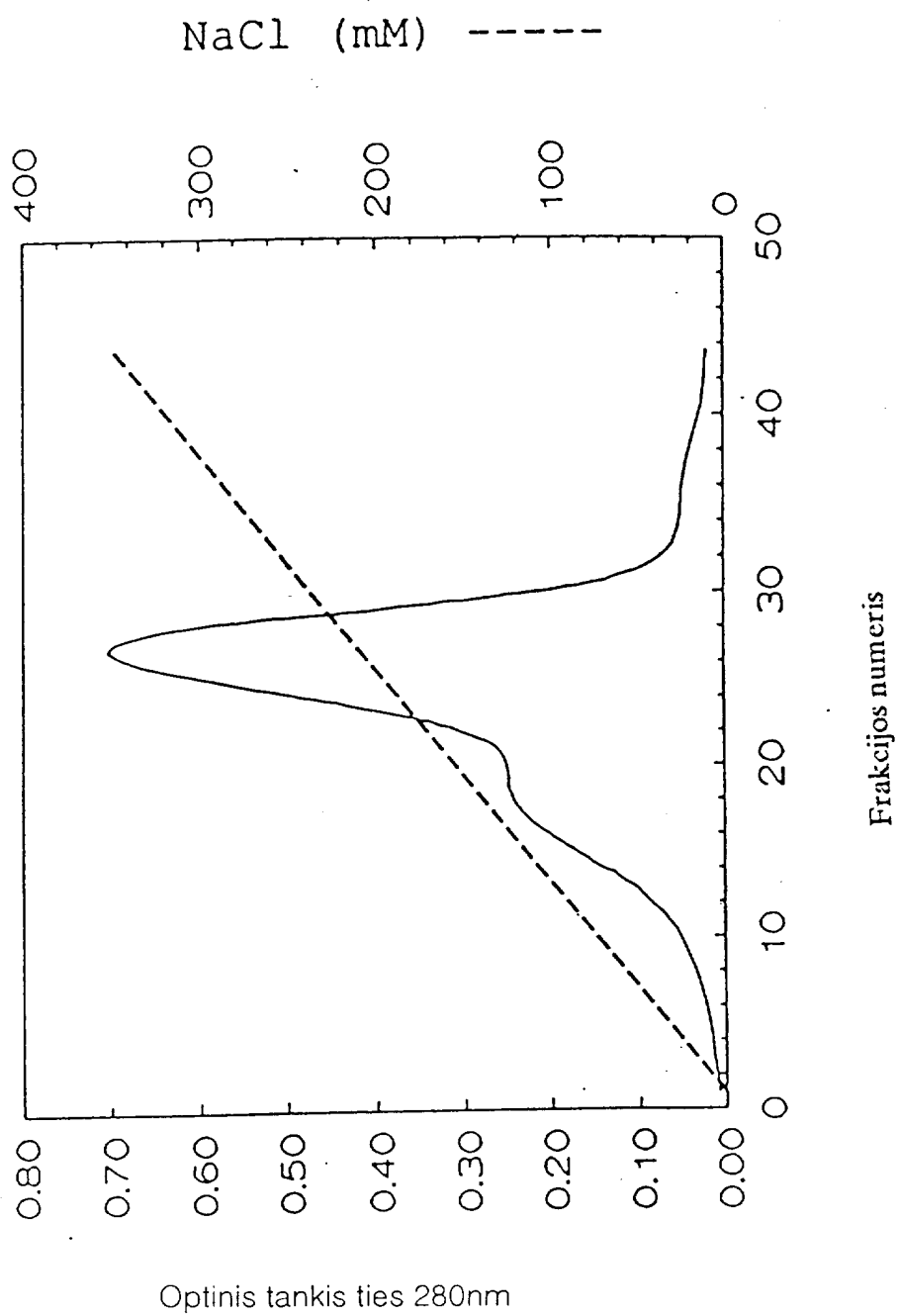


Fig.33



Pracianti tėkmė C4

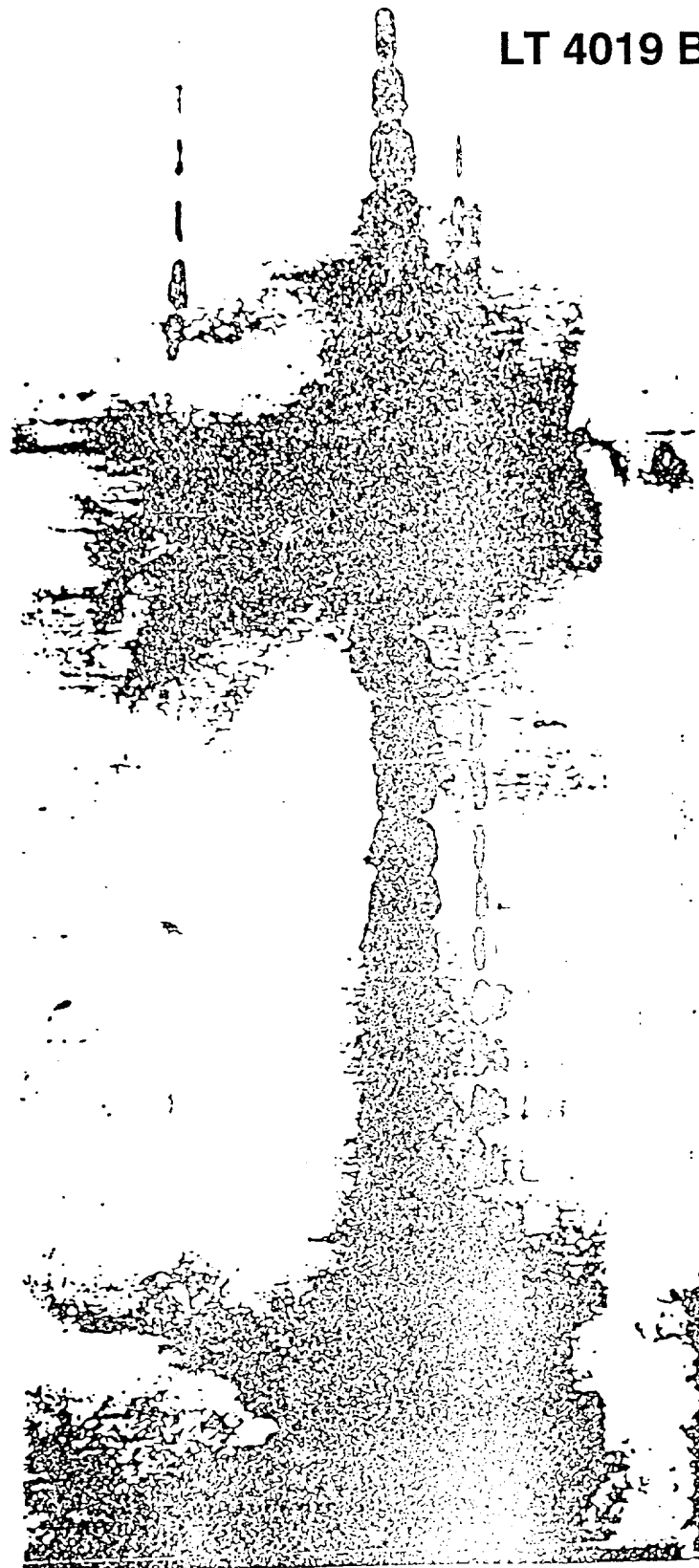
Pakrovimas C4

Pakrovimas S-sefaroze

Fig.34a

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

974
662
427
311
215



LT 4019 B

Fig.34b

Praeinanti tēkmē C4

Pakrovīmas C4

Pakrovīmas S-sefaroze

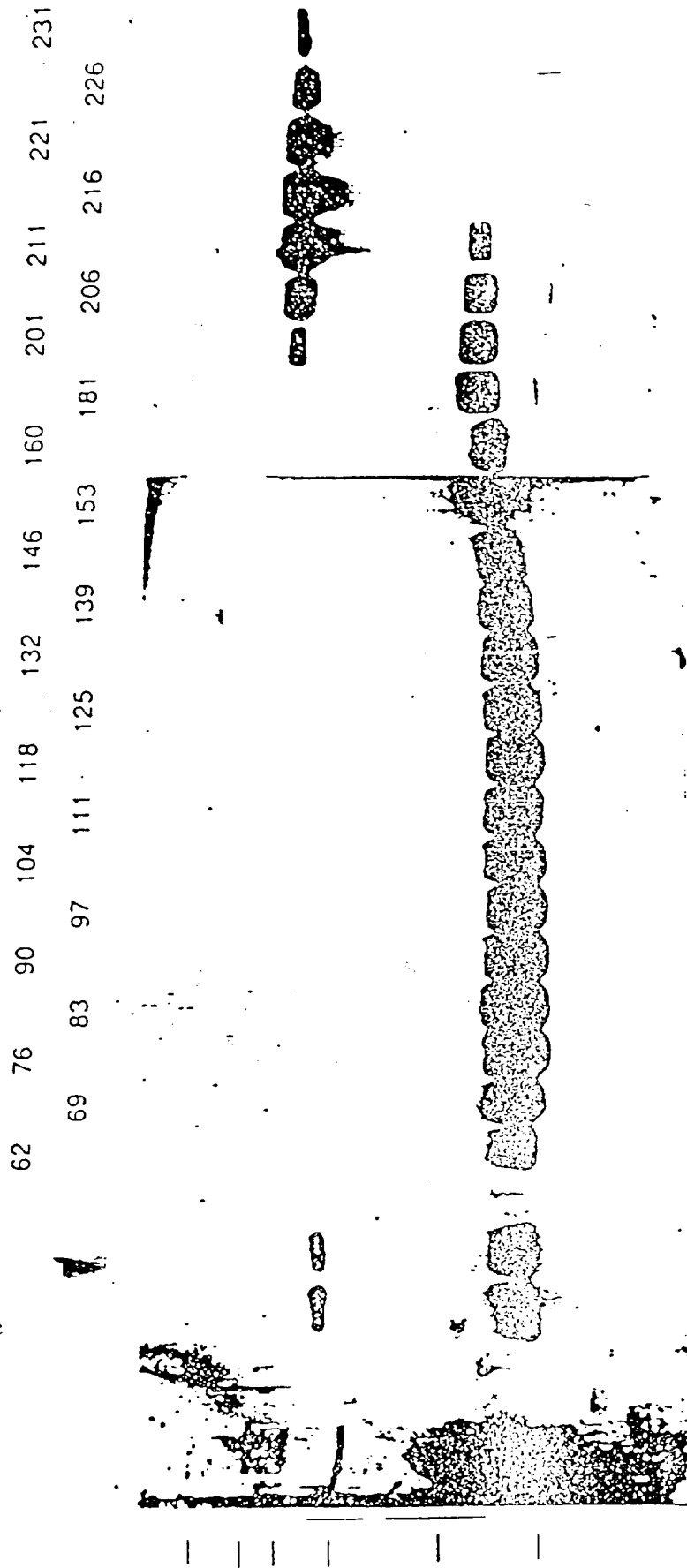


Fig.35

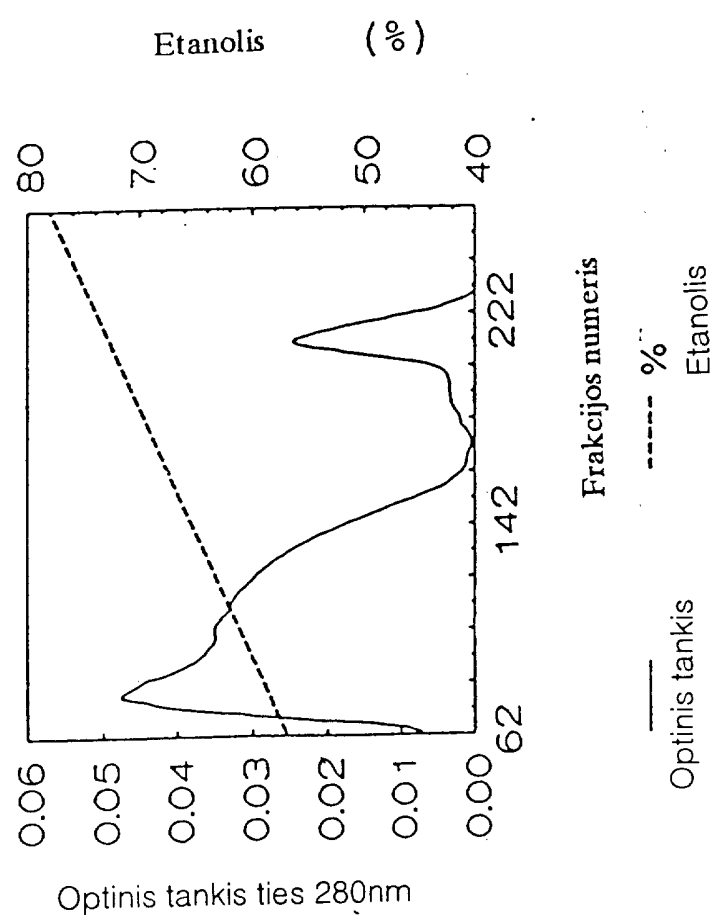


Fig.36

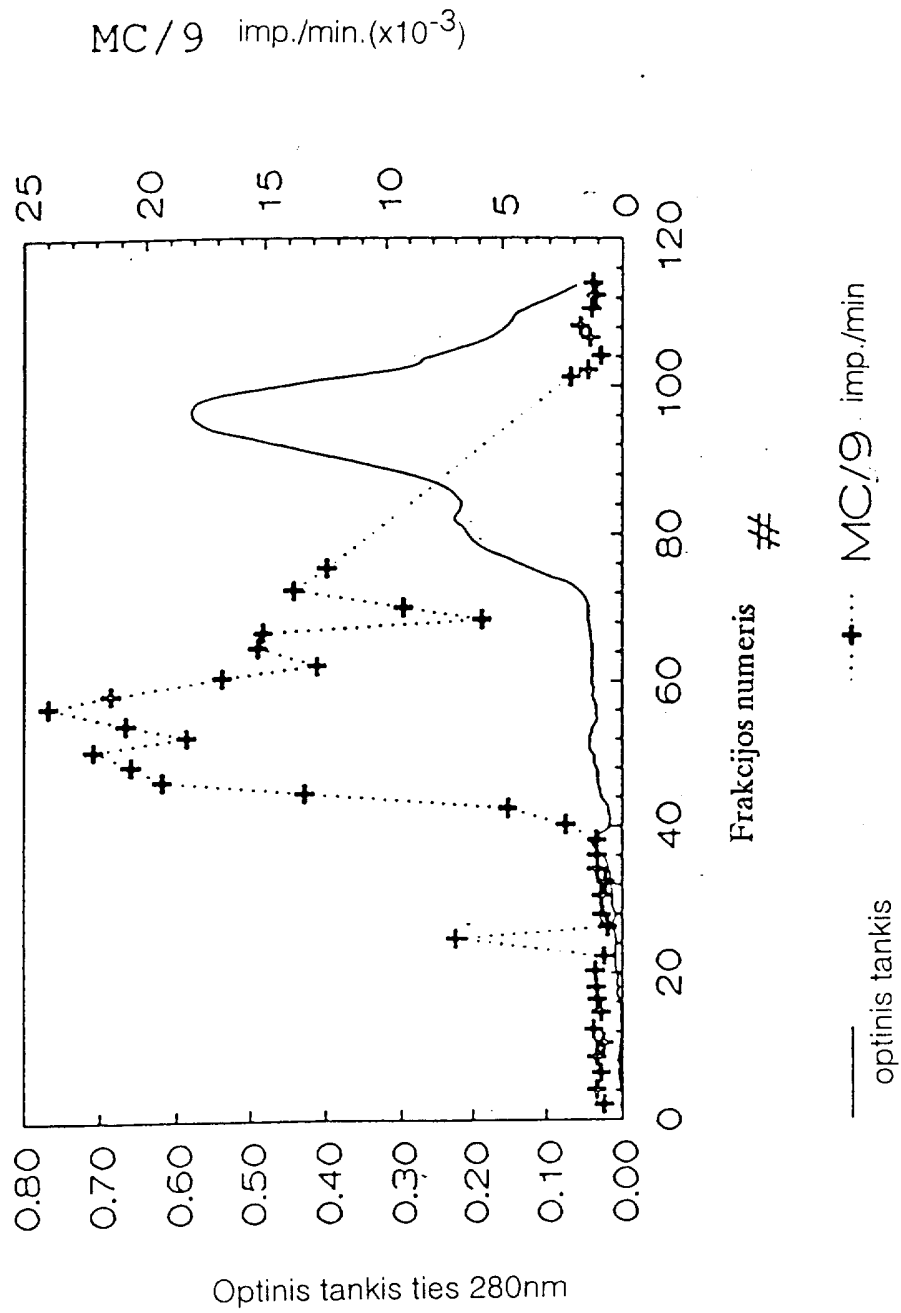


Fig.37

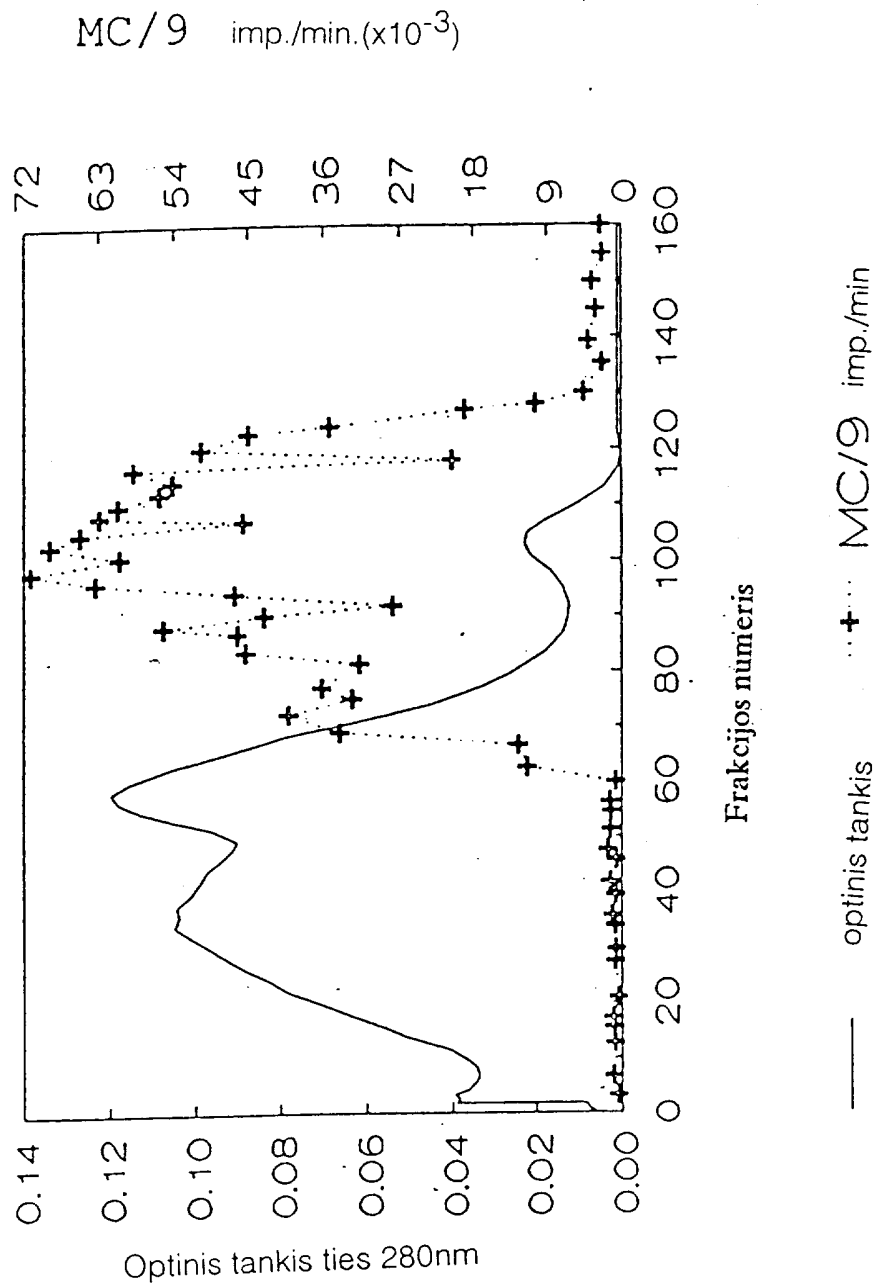


Fig.39

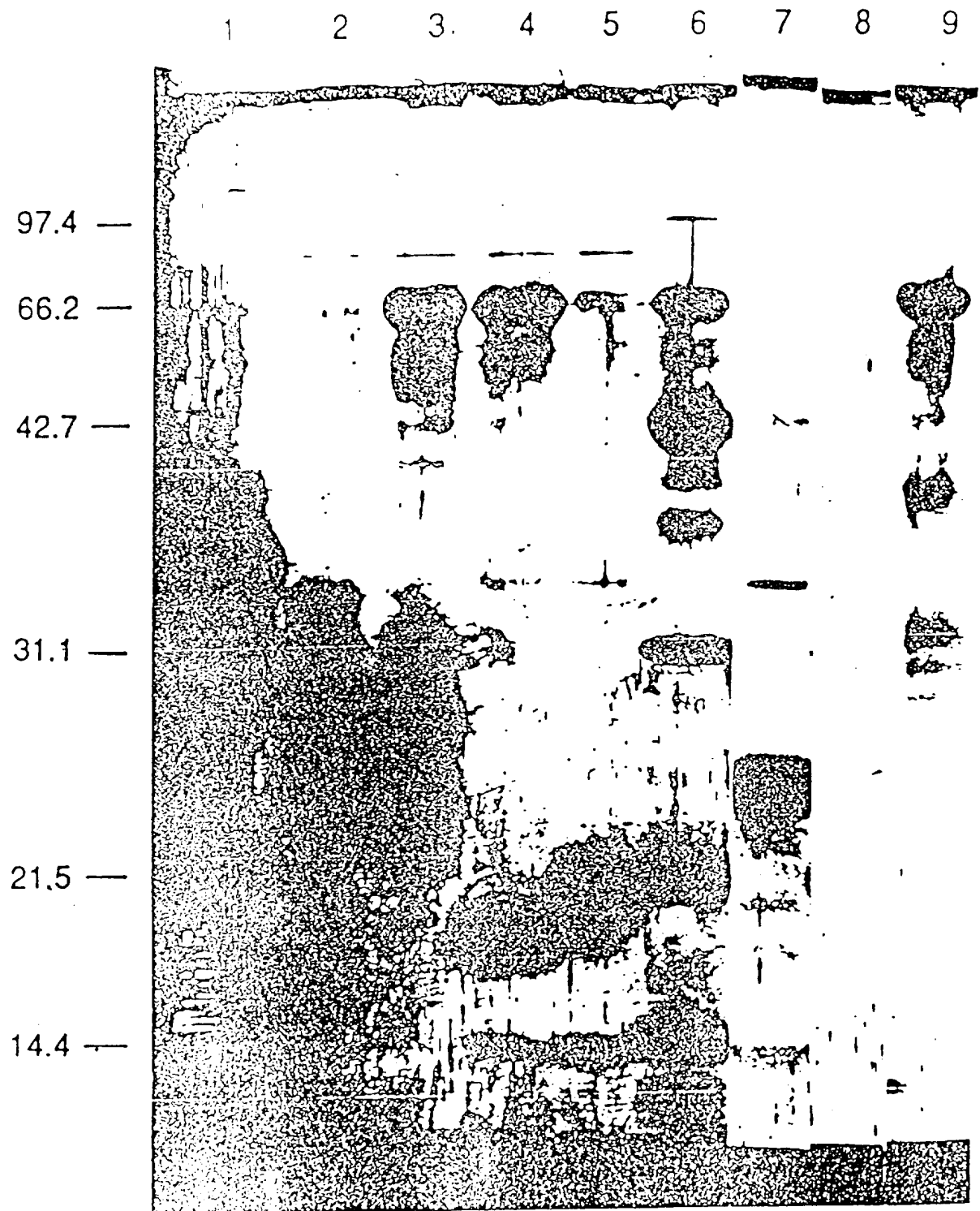


Fig.40a

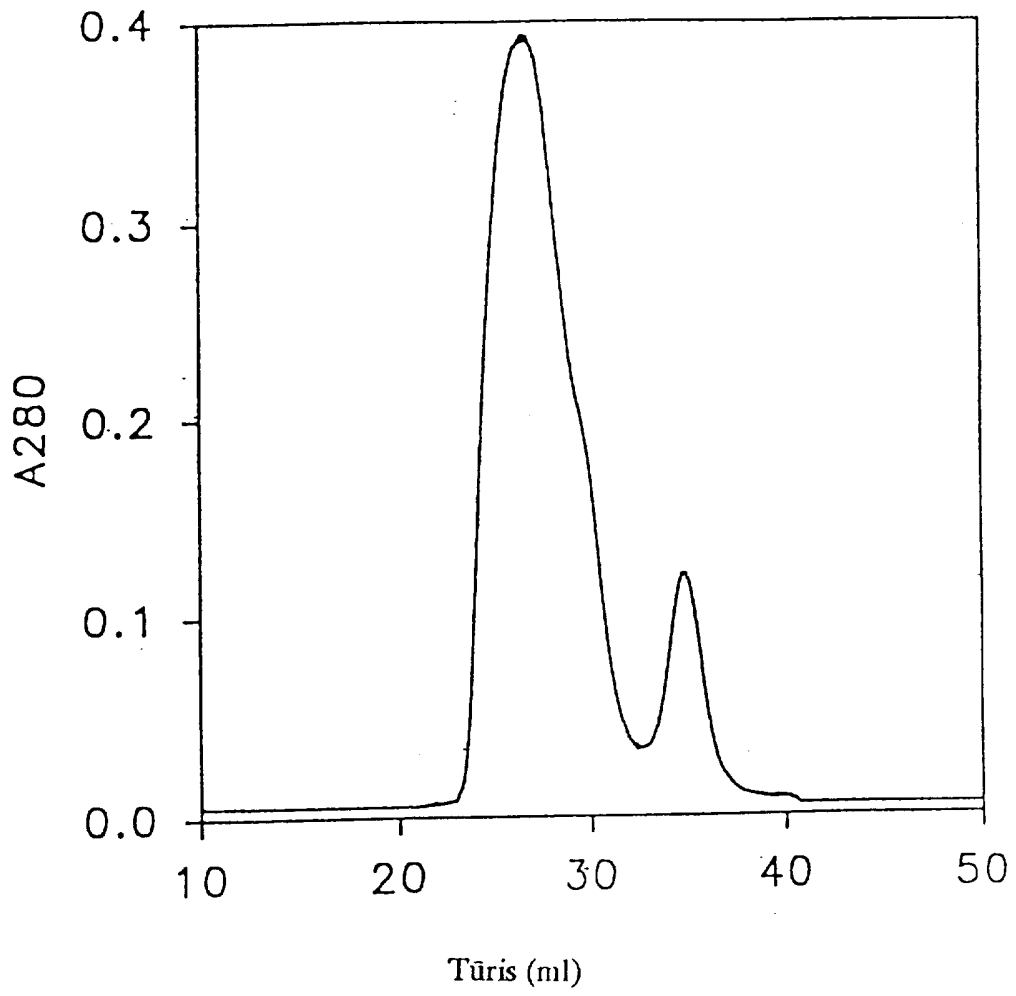


Fig.40b

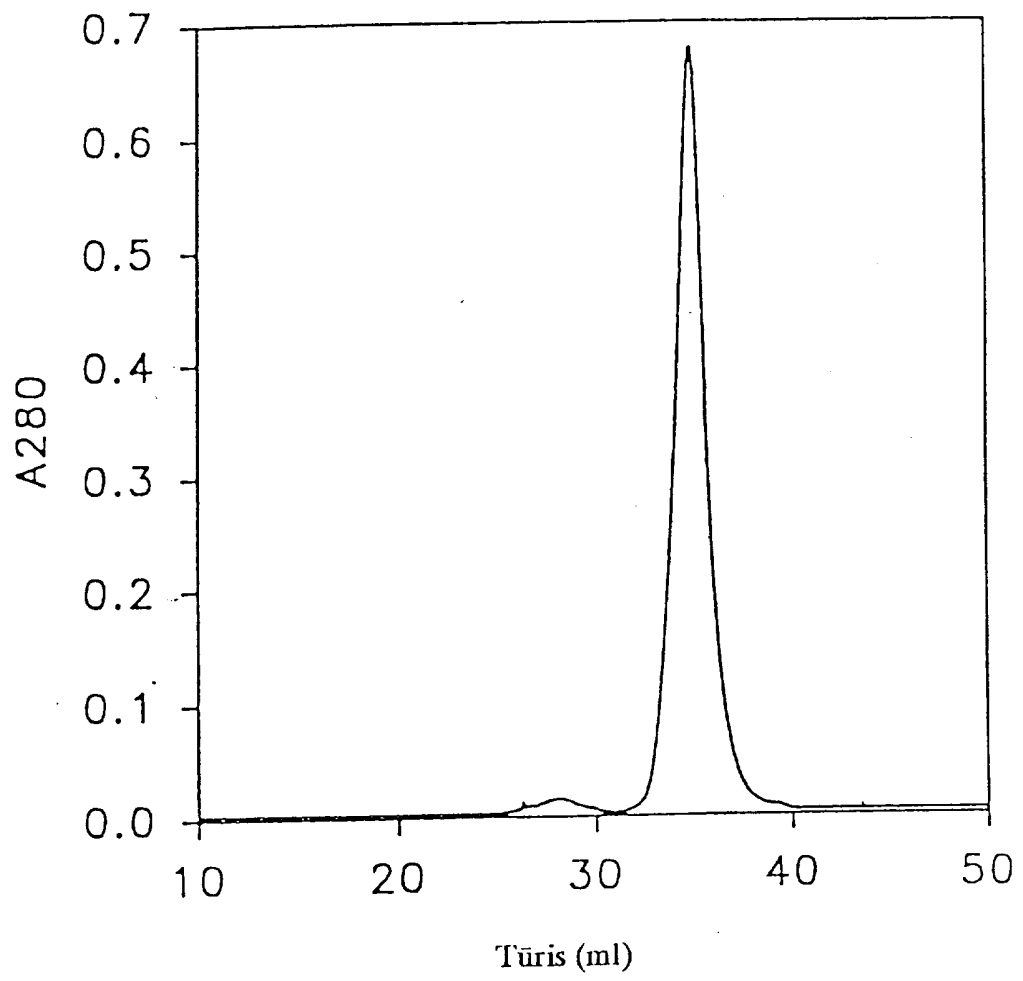


Fig.41

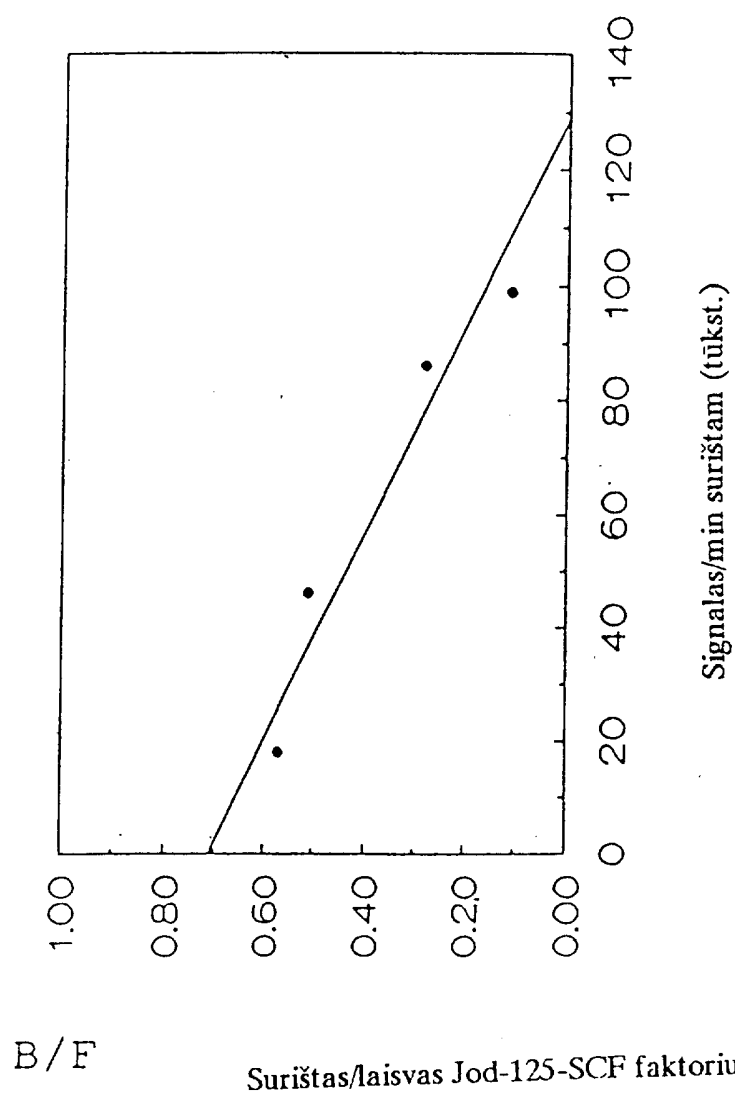


Fig.42a

CCGCCCTCGCGCCGAGACTAGAACCGCTGCGGGAAGCAGGACAGTGGAGAGGGCGCTGCGC	61
TCGGGGCTACCCCAATGCGTGGAATCTGCGCGCGCTGTTGCTGCAATATGCTGGAGCTCCA	122
GAACAGCTAAACGGAGTCGCCACACCACTGTTGTGCTGGATCGCAGCGCTTCCTT	183
-25	
Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Leu Thr Cys Ile Tyr Leu Gln	
ATG AAG AAG ACA CAA ACT TGG ATT CTC ACT TGC ATT TAT CTT CAG	228
-10	
Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg	
CTG CTC CTA TTT AAT CCT CTC GTC AAA ACT GAA GGG ATC TGC AGG	273
1	
20	
Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala	
AAT CGT GTG ACT AAT AAT GTA AAA GAC GTC ACT AAA TTG GTG GCA	318
30	
Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly	
AAT CTT CCA AAA GAC TAC ATG ATA ACC CTC AAA TAT GTC CCC GGG	363
40	
Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val	
ATG GAT GTT TTG CCA AGT CAT TGT TGG ATA AGC GAG ATG GTA GTA	408
50	
60	
Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn	
CAA TTG TCA GAC AGC TTG ACT GAT CTT CTG GAC AAG TTT TCA AAT	453

Fig.42b

Ile	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	80
ATT	TCT	GAA	GGC	TTG	AGT	AAT	TAT	TCC	ATC	ATA	GAC	AAA	CTT	GTG	498
Asn	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Cys	Val	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	90
AAT	ATA	GTG	GAT	GAC	CTT	GTG	GAG	TGC	GTG	AAA	GAA	AAC	TCA	TCT	543
Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Leu	Phe	100
AAG	GAT	CTA	AAA	AAA	TCA	TTC	AAG	AGC	CCA	GAA	CCC	AGG	CTC	TTT	110
Thr	Pro	Glu	Glu	Phe	Phe	Arg	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	120
ACT	CCT	GAA	GAA	TTC	TTT	AGA	ATT	TTT	AAT	AGA	TCC	ATT	GAT	GCC	633
Phe	Lys	Asp	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Thr	Ser	Asp	Cys	Val	Val	130
TTC	AAG	GAC	TTT	GTA	GTG	GCA	TCT	GAA	ACT	AGT	GAT	TGT	GTG	GTT	140
Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Asp	Ser	Arg	Val	Ser	Val	Thr	150
TCT	TCA	ACA	TTA	AGT	CCT	GAG	AAA	GAT	TCC	AGA	GTC	AGT	GTC	ACA	723

Fig.42c

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

Fig.42d

TGGTAACAGTTCATGTTTGCTTCATAAATGAAGCAGCTTTAAACAAATTCATATTCTGTC 1104
TGGAGTGACAGACCACATCTTATCTGTCTTGCTAACCATGACTTTATATGGATGATTC 1164
AGAAATTGGAACAGAATGTTTACTGTGAAACTGGCACTGAATTATCATCTATAAGAA 1224
GAACTTGCATGGAGCAGGACTCTATTTTAAAGACTGCGGACTTGGGTCTCATTTAGAAC 1284
TTGCAGCTGATGTTGGAAGAGAAGCACC GTCTCAGACTGCATGTACCAATTGCATGGC 1344
TCCAGAAATGCTCTAAATGCTGAAAAAACACCTAGCTTTATTTCTCAGATACAAACTGCAG 1404

Fig.43

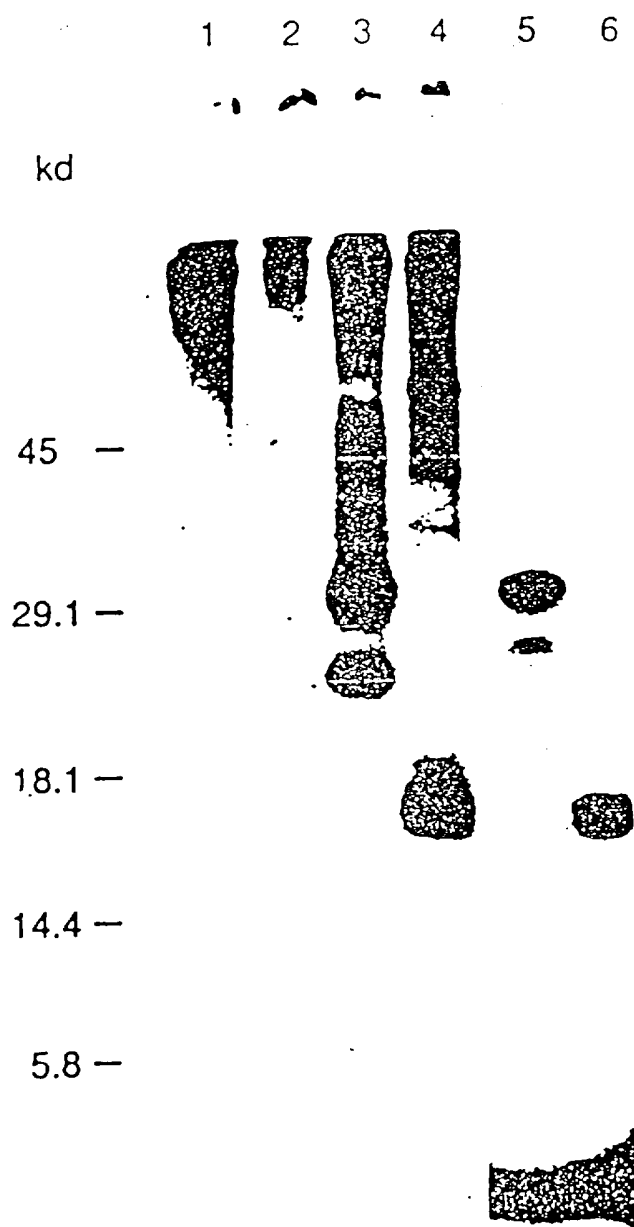


Fig.44a

	AGCAGGGACAGTGAGAGGGCGCTGCGCTC	30
	GGGCTACCCAATGCGTGACTATCTGCCGCCGCTGTTGTCGCAATATGCTGGAGCTCCAG	90
	AACAGCTAAACGGAGTCGCCACACCACTGTTGTGCTGGATCGCAGCGCTGCCCTTCCTT	150
-25		
	-20	
Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Leu Thr Cys Ile Tyr Leu Gln		
ATG AAG AAG ACA CAA ACT TGG ATT CTC ACT TGC ATT TAT CTT CAG		195
-10		
	1	
Leu Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg		
CTG CTC CTA TTT AAT CCT CTC GTC AAA ACT GAA GGG ATC TGC AGG		240
	10	
Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala		
AAT CGT GTG ACT AAT AAT GTA AAA GAC GTC ACT AAA TTG GTG GCA		285
	30	
Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly		
AAT CTT CCA AAA GAC TAC ATG ATA ACC CTC AAA TAT GTC CCC GGG		330
	40	
Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val		
ATG GAT GTT TTG CCA AGT CAT TGT TGG ATA AGC GAG ATG GTA GTA		375
	50	

Fig. 44b

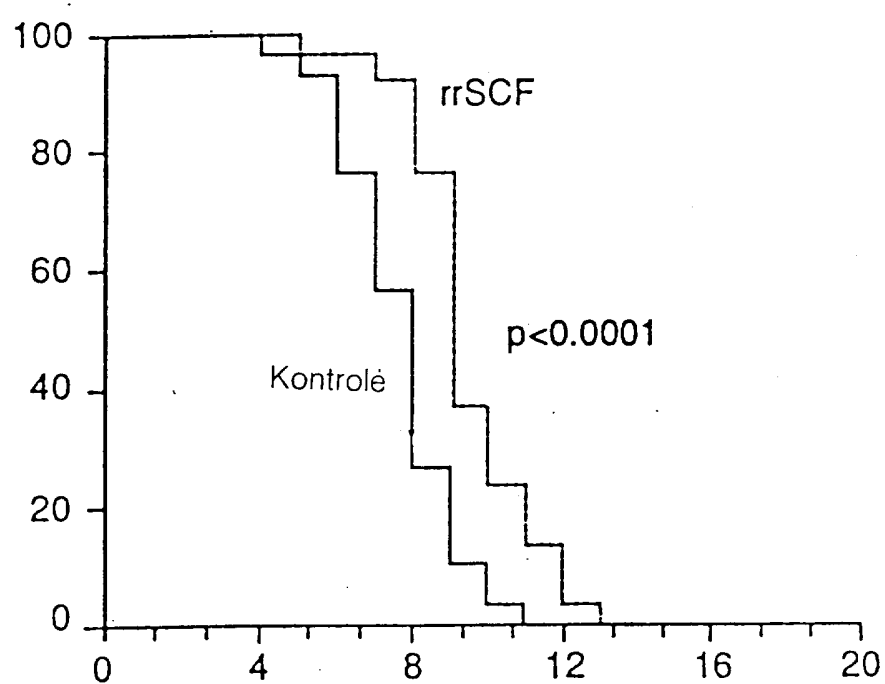
Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Ser	Asn	
CAA	TTG	TCA	GAC	AGC	TTG	ACT	GAT	CTT	CTG	GAC	AAG	TTT	TCA	AAT	420
Ile	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	80
ATT	TCT	GAA	GGC	TTG	AGT	AAT	TAT	TCC	ATC	ATA	GAC	AAA	CTT	GTG	465
Asn	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Cys	Val	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	
AAT	ATA	GTG	GAT	GAC	CTT	GTG	GAG	TGC	GTG	AAA	GAA	AAC	TCA	TCT	510
Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Leu	Phe	110
AAG	GAT	CTA	AAA	AAA	TCA	TTC	AAG	AGC	CCA	GAA	CCC	AGG	CTC	TTT	555
Thr	Pro	Glu	Glu	Phe	Phe	Arg	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	
ACT	CCT	GAA	GAA	TTC	TTT	AGA	ATT	TTT	AAT	AGA	TCC	ATT	GAT	GCC	600
Phe	Lys	Asp	Phe	Val	Val	Ala	Ser	Glu	Thr	Ser	Asp	Cys	Val	Val	140
TTC	AAG	GAC	TTT	GTA	GTG	GCA	TCT	GAA	ACT	AGT	GAT	TGT	GTG	GTT	645
Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Lys	Ala	Lys	Asn	Pro	Pro	
TCT	TCA	ACA	TTA	AGT	CCT	GAG	AAA	GGG	AAG	GCC	AAA	AAT	CCC	CCT	690

Fig.44c

Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala Met Ala Leu Pro Ala Leu	160	170
GGA GAC TCC AGC CTA CAC TGG GCA GCC ATG GCA TTG CCA GCA TTG		735
Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Leu Tyr Trp Lys	180	
TTT TCT CTT ATA ATT GGC TTT GCT TTT GGA GCC TTA TAC TGG AAG		780
Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu Asn Ile Gln Ile	190	200
AAG AGA CAG CCA AGT CTT ACA AGG GCA GTT GAA AAT ATA CAA ATT		825
Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg	210	
AAT GAA GAG GAT AAT GAG ATA AGT ATG TTG CAA GAG AAA GAG AGA		870
Glu Phe Gln Glu Val Galas	220	
GAG TTT CAA GAA GTG TAA TTGTGGCTTGTAACAACACTGTACTTTCGTA		920
CATTGGCTGGTAACAGTTCATGTTTGCTTCATAAATGAAGCAGCTTTAAACAATTGATA		980
TTCTGTCTGGAGTGACAGACACACATCTTATCTGTCTTGCTACCCATGACTTTATATGG		1040
ATGATTCAGAAATTGGAACAGAAATGTTTACTGTGAAACTGGCACTGA		1088

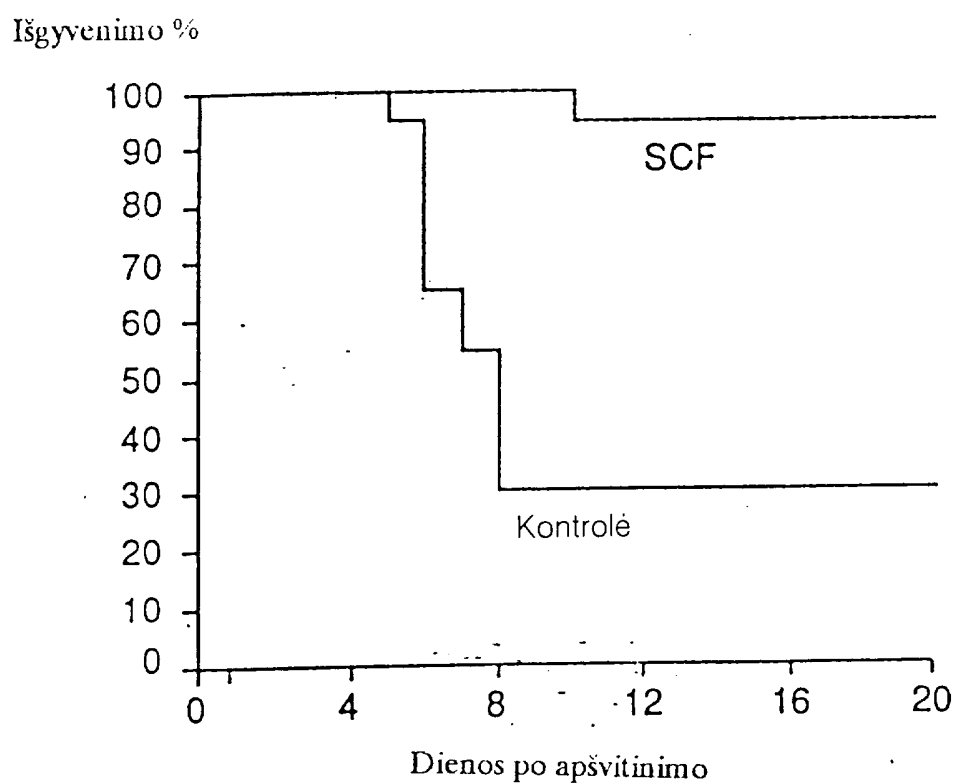
Fig.45

Išgyvenimo %



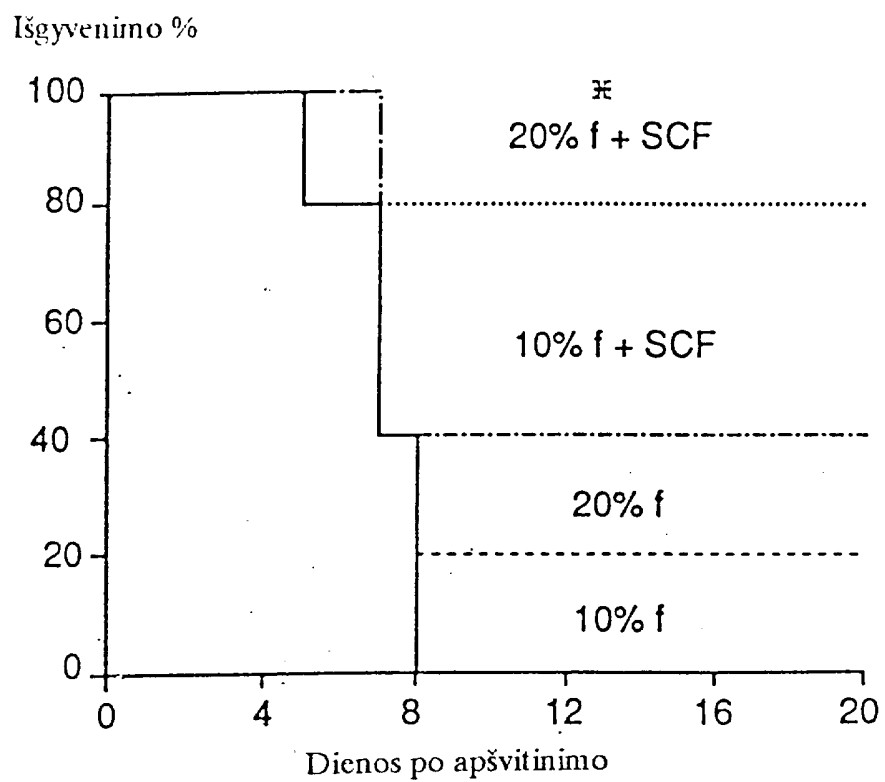
Dienos po apšvitinimo

Fig.46



850 rad., transplantuota 5% klubo kaulo

Fig.47



950 rad

$\times f$ = klubo kaulas