

(19)



(10) **LT 4120 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

-
- (11) Patento numeris: **4120**
- (21) Paraiškos numeris: **96-118**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1996 08 02**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 12 27**
- (45) Patento paskelbimo data: **1997 03 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US94/14553**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1994 12 28**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 08 02**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **176553, 1994 01 03, US**
185607, 1994 01 21, US
196689, 1994 02 15, US
223263, 1994 04 04, US
249376, 1994 05 25, US
348657, 1994 12 02, US
348658, 1994 12 02, US
- (72) Išradėjas:
Dan L. Eaton, US
Frederic J. de Sauvage, US
- (73) Patento savininkas:
GENENTECH, INC, 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco,
CA 94080, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT
-

(54) Pavadinimas:
Trombopoetinas

(57) Referatas:

Pateikti išskirtas trombopoetinas, išskirta DNR, koduojanti trombopoetina, rekombinantiniai arba sintetiniai

LT 4120 B

trombopoetino gavimo ir gryninimo būdai. Buvo parodyta, kad įvairios trombopoetino formos turi įtakos kraujo ląstelių, ypač megakariocitų ir megakariocitų pirmtakų replikacijai, diferenciacijai arba brendimui. Todėl šie junginiai gali būti naudojami gydant trombocitopeniją.

IŠRADIMO SRITIS

5 Šis išradimas susietas su baltymų, įtakojančių hemopoetinių ląstelių, ypač trombocitų pirmtakų, išlikimą, proliferaciją, diferencijaciją arba brendimą, išskyrimu, gryninimu, o taip pat su genoinžinierine arba chemine sinteze. Šis išradimas susijęs su nukleino
10 rūgščių, koduojančių baltyminių ligandų, kuris susiriša su citokinų receptorių superšeimos nariu *mpl* ir aktyvuoja jį, klonavimu ir ekspresija. Toliau šis išradimas susietas su šių baltymų (atskirai ir kartu su kitais citokinais) pritaikymu, gydant imunines arba hemopoetinės sistemos sutrikimus, tame tarpe ir trombocitopeniją.

IŠRADIMO PAGRINDAS

1. Hemopoetinė sistema.

20 Hemopoetinė sistema produkuoja subrendusias specializuotas kraujo ląsteles, būtinas žinduolių išgyvenimui. Šios subrendusios ląstelės yra: eritrocitai, transportuojantys deguonį ir anglies dvideginį, T- ir B-limfocitai, atsakingi už ląstelinių ir humoralinių imuninių atsaką, trombocitai, būtini kraujo krešėjimui, bei granuliocitai ir makrofagai, kurie yra specilizuoti fagocitozei ir veikia kaip pagalbinės ląstelės kovojant su infekcija. Savo ruožtu tarp granuliocitų išskiriami: neutrofilai, eozinofilai, bazofilai
30 ir tukliosios ląstelės; kiekvienas šių ląstelių tipas turi savo atskiras funkcijas. Pasirodo, visos šios subrendusios specializuotos ląstelės kyla iš vieningo bendro primityvaus ląstelių tipo, kuris vadinamas pliuripotentinėmis (daugiapotentinėmis arba totipotentinėmis) kamieninėmis ląstelėmis, pirma karta

atrastomis kaulų čiulpuose (Dexteer et al., *Am. Rev. Cell Biol.*, 3:423-441[1987]).

Subrendusios specializuotos kraujo ląstelės turi būti produkuojamos dideliais kiekiais per visa žinduolio gyvenimą. Didžioji dauguma šių specializuotų kraujo ląstelių išlieka funkcionaliai aktyvioje būklėje nuo kelių valandų iki kelių savaičių (Cronkite et al., *Blood cells*, 2:263-284 [1976]). Todėl žinduolio kraujo ląstelių homeostazei palaikyti būtinas visų brendimo etapų ląstelių pastovus atsinaujinimas: pradedant nuo pačių kamieninių ląstelių, tarpinių, dalinai specializuotų pirmtakų ir baigiant subrendusiomis kraujo ląstelėmis.

Visos hemopoetinės sistemos pagrindas yra pliuripotentinės kamieninės ląstelės. Šių ląstelių kiekis yra sąlyginai mažas; jos pastoviai atsinaujina pasidalindamos į dukterines kamienines ląsteles arba vystosi diferenciacijos keliu, kai transformuojasi per eilę diferenciacijos etapų į vis labiau subrendusias įvairiomis šakomis specifines ląsteles-pirmtakus, kol pasiekia aukščiausią diferenciacijos lygį - specializuotas subrendusias kraujo ląsteles.

Pavyzdžiui, tam tikros multipotentinės ląstelės-pirmtakai, vadinamos CFC-Mix, kilusios iš kamieninių ląstelių, gali arba proliferuoti (atsinaujinti) arba diferencijuotis ir sudaryti kolonijas, kurių sudėtyje yra įvairios mieloidinės ląstelės: eritrocitai, neutrofilai, megakariocitai, trombocitų pirmtakai, makrofagai, bazofilai, eozinofilai ir tukliosios ląstelės. Kitos ląstelės-pirmtakai priklauso limfoidinei atšakai ir po proliferacijos bei brandos išsivysto į T- ir B-ląsteles.

Be to, tarp CFC-Mix pirmtakų ir mieloidinių ląstelių yra eilė žemesnio rango ląstelių-pirmtakų, kurių galimybės diferencijuotis yra ribotos. Šie specifiniai pirmtakai klasifikuojami pagal jų pali-

kuonis. Žinomi šie tarpiniai mieloidinės atšakos ląstelių pirmtakai: eritroidiniai kolonijas formuojantys vienetai (CFU-E) - eritrocitams; granulocitų/makrofagų kolonijas formuojančios ląstelės (GM-CFC) - neutrofilams ir makrofagams; megakariocitų kolonijas formuojančios ląstelės (Meg-CFC) - megakariocitams; eozinofilų kolonijas formuojančios ląstelės (Eos-CFC) - eozinofilams; ir bazofilų kolonijas formuojančios ląstelės (Bas-CFC) tukliosioms ląstelėms.

10 Tarp pliuripotentinių kamieninių ląstelių ir subrendusių kraujo ląstelių žinomi ir kiti tarpiniai pirmtakai (žiūr. žemiau). Tikimasi atrasti dar daugiau tokio tipo ląstelių-pirmtakų, kurie skirtūsi pagal specifiškumą vienai ar kitai ląstelių atšakai ir pagal

15 savo galimybes atsinaujinti.

Pagrindinis normalios hemopoetinės sistemos vieklos principas yra toks: ląstelių sugebėjimas atsinaujinti sumažėja, mažėjant jų multipotencijai ir didėjant specifiškumui tam tikrai atšakai. Tokiu būdu,

20 viename hematopoetinių ląstelių spektro gale yra pliuripotentinės kamieninės ląstelės, kurios sugeba atsinaujinti ir diferencijuotis į visų tipų riboto potencialumo ląsteles-pirmtakus. Būtent šia kamieninių ląstelių savybe naudojasi kaulų čiulpų transpalantacijos terapija, kai primityvios kamieninės trans-

25 plantanto ląstelės iš naujo užsieja visą hemopoetinių ląstelių sistema. Kitame spektro gale yra atskirom hemopoetinėm ląstelių atšakom specifiniai pirmtakai ir jų palikuonys, kurie jau prarado sugebėjimą atsinau-

30 jinti, bet įgijo brandų funkcionalų aktyvumą.

Kamieninių ir atšakai specifinių ląstelių-pirmtakų proliferacija ir vystymasis kontroliuojami hematologiniais augimo faktoriais arba citokinais. Šių faktorių vaidmuo *in vivo* yra sudėtingas ir nevisiškai

35 išaiškintas. Kai kurie augimo faktoriai, kaip interleukinas-3 (IL-3) gali stimuliuoti ir multipotentines

kamienines ląsteles, ir kelių atšakų ribotos potencijos ląsteles-pirmtakus, tarp jų ir megakariocitų pirmtakus. Ankščiau buvo manoma, kad kiti faktoriai, tokie kaip granulocitų makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-CSF) veikia tik GM-CFC. Tačiau vėliau buvo išaiškinta, kad GM-CSF taip pat įtakoja *interalia* megakariocitų proliferaciją ir vystymąsi. Tokiu būdu, buvo parodyta, kad IL-3 ir GM-CSF biologiniai aktyvumai persidengia, tačiau jų poveikis skiriasi. Neseniai buvo taip pat parodyta, kad interleukinas 6 (IL-6) ir interleukinas 11 (IL-11), kurie patys savaime neturi įtakos megakolonijų formavimuisi, veikiant kartu su IL-3 žymiai sustiprina pastarojo stimuliuojamą megakariocitų brendimą (Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, 20:1011-1016 [1992]).

Tuo būdu, hemopoetiniai augimo faktoriai gali veikti vienos ar daugiau atšakų ląstelių augimą bei diferenciaciją, jų aktyvumai gali persidengti su kito augimo faktoriaus aktyvumu, veikiant tam tikras ląsteles-pirmtakus; vieni augimo faktoriai gali sustiprinti kitų augimo faktorių poveikį ląstelėms.

Taip pat parodyta, kad hemopoetiniai augimo faktoriai gali veikti įvairiose ląstelių vystymosi stadijose: pluriotentines kamienines ląsteles, visų lygių tarpinius pirmtakus ir subrendusias kraujo ląsteles. Pavyzdžiui, eritropoetinas (EPO) indukuoja tik eritroidinių pirmtakų proliferaciją. IL-3 veikia ankstesnėje vystymosi stadijoje, įtakodamas primityvių kamieninių ląstelių ir tarpinių ląstelių-pirmtakų vystymąsi. Kiti augimo faktoriai, tokie kaip kamieninių ląstelių faktorius (SCF) veikia dar primityvesnių ląstelių vystymąsi.

Vertinant iš ateities perspektyvos, naujų hemopoetinių augimo faktorių, veikiančių kraujo ląstelių ir jų pirmtakų gyvybingumą, proliferaciją, diferenciaciją ir brendimą, atradimas būtų labai

svarbus, perspektyvus ir naudingas, ypač atstatant hemopoetinę sistemą, pažeistą ligos, radio- ar chemoterapijos.

5 **II. Megakariocitopoezė - trombocitų produkcija**

Megalokariocitopoezės ir trombocitų produkcijos reguliacija nuodugniai aprašyta apžvalginiuose straipsniuose: Mazur, *Exp. Hematol.*, 15:248 [1987] ir Hoffman, *Blood*, 74:1196-1212 [1989]. Režiumuojant

10 trumpai, kaulų čiulpų pliuripotentinės ląstelės diferencijuojasi į megakariocitų, eritrocitų ir mielocitų ląstelių linijas (atšakas). Manoma, kad tarp kamieninių ląstelių ir megakariocitų egzistuoja tarpinių megakariocitų ląstelių-pirmtakų hierarchija. Identifikuotos

15 mažiausiai trys megakariocitų pirmtakų klasės: intensyvaus augimo židinius formuojančių vienetų megakariocitai (BFU-MK), kolonijas formuojančių vienetų megakariocitai (CFU-MK) ir mažo tankio megakariocitų ląstelės-pirmtakai (LD-CFU-MK). Megakariocitų brendimas

20 pats savaime yra nenutrūkstantis vystymosi procesas, kurio suskirstymas į atskiras stadijas remiasi standartiniais morfologiniais kriterijais. Akstyviausias atpažįstamas megakariocitų (MK arba meg) šeimos narys yra megakarioblastas. Šios ląstelės pradžioje būna 20-

25 30 µm diametro su bazofiline citoplazma ir turi šiek tiek netaisyklingos formos branduolį su netankiu, kiek tinkluotu chromatinu ir keliais branduolėliais. Vėliau megakarioblastai (poliploidiniai) gali turėti iki 32 branduolių, bet citoplazma lieka nesubrendusi. Prasidėjus brendimui, branduolys tampa labiau skiltelėtas, citoplazmos kiekis padidėja, ji pasidaro labiau acidofilinė ir granuliuota. Labiausiai subrendusios šios šeimos ląstelės gali atrodyti kaip yrantys trombocitai periferinėje dalyje. Normaliai mažiau kaip 10 % megakariocitų yra blasto stadijoje ir daugiau kaip 50 % yra

35

visiškai subrendę. Pagal salyginę morfologinę klasifikaciją, paprastai taikomą megakariocitams, išskiriami megakarioblastai (ankstyvoji forma), promegakariocitai arba bazofiliniai megakariocitai (tarpinė forma) ir subrendę (acidofiliniai, granulocitai arba trombocitus 5 produkuojantys) megakariocitai (vėlyvosios formos). Subrendusieji megakariocitai išleidžia citoplazminius filamentus į sinusoidalinę erdvę, kur šie atsiskiria ir fragmentuojasi į individualius trombocitus (Williams 10 *et. al.*, *Hematology*, 1972).

Manoma, kad megakariocitopoezės procese dalyvauja daug reguliatorinių faktorių (Williams *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 52:173 [1982] ir Williams *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 110:101 [1982]). Teigiama, kad ankstyvoji 15 megakariocitopoezės stadija yra mitotinė ir priklauso nuo lastelių proliferacijos, kolonijų formavimosi iš CFU-MK, bet nepriklauso nuo trombocitų skaičiaus kraujyje (Burstain *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 109:333 [1981] ir Kimura *et al.*, *Exp., Hematol.*, 13:1048 [1985]). 20 Vėlyvoji brendimo stadija nemitotinė, susijusi su branduolių poliploidizacija ir citoplazmos brendimu ir veikiausiai grįžtamai reguliuojama periferinių trombocitų skaičiumi. (Odell *et al.*, *Blood*, 48:765 [1976] ir Ebbe *et al.*, *Blood*, 32: 787 [1968]).

25 Apie atskiro specifinio megakariocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (MK-CSF) egzistavimą buvo diskutuojama literatūroje (Mazur, *Exp. Hematol.*, 15: 340-350 [1987]). Daugumos autorių nuomone, toks gyvybiškai svarbus procesas kaip trombocitų produkcija 30 turėtų būti reguliuojamas citokino (citokino), atsakingo būtent už šį procesą. Ši hipotezė paskatino jau 30 metų besitęsiančią tokio specifinio citokino paiešką, tačiau iki šiol nebuvo išskirtas, sekvenuotas ir charakterizuotas joks citokinas, kuris būtų tik MK-CSF 35 (TPO).

Nors buvo paskelbti darbai, teigiantys, kad iš dalies pasisekė išgryninti MK-CSF iš kelių šaltinių: iš gyvūnų su eksperimentiškai sukelta trombopenija plazmos (Hil et al., *Exp. Hematol.*, 14:752 [1986]); iš 5 žmogaus embrioninių inkstų ląstelių kultūros kondicionuotos terpės [CM] (McDonald et al., *J. Lab., Clin. Med.*, 85:59 [1975]); iš žmonių, sergančių plastine anemija ir idiopatine trombocitopenija purpura, šlapimo ekstraktų (Kawakita et al., *Blood*, 6:556 [1983]) ir 10 plazmos (Hoffman et al., *J. Clin. Invest.*, 75:1174 [1985]), bet šių faktorių fiziologinė funkcija daugeliu atvejų lieka neišaiškinta.

Kondicionuotos terpės, kurioje augo *Phytolacca americana*, mitogenų aktyvuotos blužnies ląstelės (PWM-SpCM) ar pelių mielomonocitų ląstelių linija WEHI-3 15 (WEHI-3CM), buvo naudojamos kaip megakariocitų stimulatoriai. PWM-SpCM sudėtyje yra faktoriai, kurie paskatina CFU-MK augimą (Metcalf et al., *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:1744-1748 [1975]; Quesenberry et 20 al., *Blood*, 65:214 [1985] ir Iscove, N. N., in *Hematopoietic Cell Differentiation, ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, Golde et al., eds. [New York, Academy Press] pp 37-52 [1978]). Vienas iš šių faktorių yra interleukinas 3 (IL-3), daugelio 25 ląstelių tipų kolonijas stimuliuojantis faktorius (multi-CSF) (Burststein, *Blood Cells*, 11:469 [1986]). Kiti šioje kondicionuotoje terpėje esantys faktoriai dar nebuvo identifikuoti ir išskirti. WEHI-3 yra pelių mielomonocitų linija, kuri sekretuoja palyginti daug 30 IL-3 ir kiek mažiau GM-CSF. Buvo parodyta, kad IL-3 skatina daugelio hemopoetinių ląstelių augimą (Ihle et al., *J. Immunol.*, 13:282 [1983]), taip pat parodyta, kad IL-3 sustiprina kitų žinomų hemopoetinių hormonų arba augimo faktorių efektą (Bartelmez et al., *J. Cell* 35 *Physiol.*, 122:362-369 [1985] ir Warren et al., *Cell*,

46:667-674 [1988]), tarp jų ir eritropoetino (EPO) bei interleukino-1 (IL-1) efekta, indukuodamas labai ankstyvius multipotentinius pirmtakus ir labai didelių mišraus tipo hemopoetinių ląstelių kolonijų formavimą.

5 Kiti megakariocitų stimulatorių šaltiniai buvo rasti terpėse, kurios buvo kondicionuojamos pelių plaučių, kaulų makrofagų ląstelių linijomis, peritonealinio eksudato ląstelėmis bei žmogaus embrioninių inkstų ląstelėmis. Nors yra prieštaringų duomenų
10 (Mazur, *Exp. Hematol.*, 15:340-350 [1987]), bet yra ir įrodymų (Geissler et al., *Br. J. Haematol.*, 60:233-238 [1985]), kad ne monocitai, o greičiau aktyvuotos T-ląstelės turi stimuliuojančios įtakos megakariocitopoezei. Šis faktas leidžia manyti, kad aktyvuotų T-
15 limfocitų sekretuojami faktoriai, tokie kaip interleukinai, gali reguliuoti MK vystymąsi (Geissler et al., *Exp. Hematol.*, 15:845-853 [1987]). Keletas darbų yra skirta išgryninto eritropoetino EPO įtakos megakariocitopoezei tyrinėjimui (Vainchenker et al., *Blood*,
20 54:940 [1979]; McLeod et al., *Nature*, 261:492-4 [1976] ir Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 [1984]). Šie tyrimai parodė, kad EPO hormonas skatina MK kolonijų formavimąsi. Šis efektas taip pat parodytas ir beseruminėse kultūrose, ir kultūrose su serumu, net ir be
25 pagalbinių ląstelių (Williams et al., *Exp. Hematol.*, 12:734 [1984]). Teigiama, kad EPO labiau dalyvauja vienos ir dviejų ląstelių megakariocitopoezės stadijose, tuo tarpu PWM-SpCM, kuris veikia megakariocitų, vystymąsi dalyvauja "keturių ląstelių" stadijose. Visu
30 šių faktorių sąveika ir ankstyvojoje ir vėlyvoje megakariocitų vystymosi fazėse dar turi būti išaiškinta.

Kelių laboratorijų nepriklausomi duomenys rodo, kad vieninteliai multi-potentiniai faktoriai, kurie turi individualų MK-kolonijas stimuliuojantį aktyvumą, yra
35 GM-CSF, IL-3 ir, mažesniu mastu, B-ląsteles stimuliuo -

jantis faktorius IL-6 (Ikebuchi et al., *Proc., Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:9035 [1987]). Neseniai keli autoriai paskelbė duomenis, kad IL-11 ir leukemiją inhibuojantis faktorius (LIF), veikdamas kartu su IL-3, padidina megakariocitų dydį ir ploidiškumą (Yonemura et al., *British Journal of Hematology*, **84**:16-23 [1993]; Burstein et al., *J. Cell. Physiol.*, **153**:305-312 [1992]; Metcalf et al., *Blood*, **76**:50-56 [1990]; Metcalf et al., *Blood*, **77**:2150-2153 [1991]; Bruno et al., *Exp. Hematol.*, **19**:378-381 [1991] ir Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, **20**:1011-1016 [1992]).

Kitos įdomios publikacijos yra: Eppsten et al., JAV patentas Nr. 4962091; Chong, JAV patentas Nr. 4879111; Fernandes et al., JAV patentas Nr. 4604377; Wissler et al., JAV patentas Nr. 4512971; Gottlieb, JAV patentas Nr. 4468379; Bennett et al., JAV patentas Nr. 5215895; Kogan et al., JAV patentas Nr. 5250732; Kimura et al., *Eur. J. Immunol.*, **20**(9):1927-1931 [1990]; Secor et al., *J. of Immunol.*, **144**(4): 1484-1489 [1990]; Warren et al., *J. of Immunol.*, **140**(1): 94-99 [1988]; Warren et al., *Exp. Hematol.*, **17**(11): 1095-1099 [1989]; Bruno et al., *Exp. Hematol.*, **17**(10):1038-1043 [1989]; Tanikawa et al., *Exp. Hematol.*, **17**(8): 883-888 [1989]; Koike et al., *Blood*, **75**(12): 2286-2291 [1990]; Lotem, *Blood*, **75**(5): 1545-1551 [1989]; Rennick et al., *Blood*, **73**(7): 1828-1835 [1989] ir Clutterbuck et al., *Blood*, **73**(6): 1504-1512 [1989].

III. Trombocitopenija

Trombocitai yra svarbiausias kraujo krešėjimo mechanizmo elementas. Cirkuliuojančių trombocitų kiekio sumažėjimas, vadinamas trombocitopenija, būdingas įvairiems klinikiniams atvejams ir sutrikimams. Pagal viešai priimtą apibūdinimą trombocitopenija yra

trombocitų kiekio sumažėjimas iki 150×10^9 ląstelių litre ir dar mažiau. Pagal trombocitų gyvavimo trukmę, išskiriamos trys pagrindinės trombocitopenijos kategorijos: (1) nepakankama trombocitų produkcija
5 kaulų čiulpuose, (2) trombocitų kaupimasis blužnyje (splenomegalija) arba (3) padidinta trombocitų destrukcija periferiniame kraujyje (pvz. autoimuninė trombocitopenija, trombocitų pažeidimas radio- arba chemoterapijos metu). Be to, kai pacientams greitai
10 suleidžiami dideli kiekiai kraujo produktų su sumažintu trombocitų kiekiu, dėl praskiedimo taip pat gali išsivystyti trombocitopenija.

Klinikiniai trombocitopenijos pasireiškimai, pvz., kraujavimas, priklauso nuo trombocitopenijos prie-
15 žasties, jos sunkumo ir galimų asocijuotų kitų krešėjimo sistemos defektų. Kaip taisyklė, pacientai su trombocitų kiekiu nuo 20×10^9 iki 100×10^9 litre rizikuoja turėti stiprų kraujavimą po traumos, tuo tarpu pacientai, kurių trombocitų kiekis mažesnis, nei
20 20×10^9 litre - gali kraujuoti spontaniškai. Tokie pacientai yra kandidatai trombocitų transfuzijai, nepaisant šią procedūrą lydinčios imuninės reakcijos ir virusinio užkrato rizikos. Esant vienodam trombocitų skaičiui kraujavimai sunkesni, jei trombocitopenijos
25 priežastis yra nepakankama trombocitų produkcija, o ne jų padidėjusi destrukcija. Pastaruoju atveju dėl pagreitintos trombocitų apykaitos kraujyje cirkuliuoja jaunesni, didesni ir hemostatiškai efektyvesni trombocitai. Trombocitopenija gali atsirasti dėl daugelio
30 priežasčių, trumpai aprašomų žemiau. Detalų aprašymą galima rasti Schafner, A. I., "Trombocitopenija ir trombocitų funkcijos pažeidimai" Internal Medicine, 3rd Ed., John J. Hutton et al., Eds., Little Brown and Co., Boston/Toronto/London [1990].

(a) Trombocitopenija sukelta nepakankamos trombocitų produkcijos

Išimtos trombocitopenijos priežastimi gali būti aplastinė anemija (Falkonio sindromas) ir įgimta amegakariocitinė trombocitopenija, kuri gali būti asocijuota su kaulų deformacijomis. Įgytus trombocitų produkcijos sutrikimus gali iššaukti arba megakariocitų hipoplazija arba neefektyvi trombopoezė. Megakariocitų hipoplazijos priežastys gali būti įvairios, tarp jų kaulų čiulpų aplazija (įskaitant ir idiopatinės formos ir chemoterapinių agentų arba radioterapijos iššauktas mielosupresijas), mielofibrozę, leukemija, metastatinių auglių bei granulomų invazija į kaulų čiulpus. Kai kuriais atvejais toksinai, infekcijos agentai, vaistai gali gana selektyviai veikti trombopoezę, pvz., laikiną trombocitopeniją gali sukelti alkoholis ir tam tikros virusinės infekcijos; nežymi trombocitopenija lydi gydymą triazidiniais diuretikais. Pabaigai reikia paminėti, kad neefektyvi trombopoezė, kaip antrinis megablastinių procesų pasireiškimas, dėl folinės rūgšties ar vitamino B₁₂ trūkumo taip pat gali sukelti trombocitopeniją, tokiais atvejais paprastai lydimą anemijos ir leukopenijos.

Gydant trombocitopenijas, kilusias dėl sumažintos trombocitų produkcijos, stengiamasi išsiaiškinti priežastį, dėl kurios sutriko normali kaulų čiulpų funkcija, ir tą priežastį pašalinti. Trombocitų transfuzija paprastai taikoma tik pacientams su labai rimtais kraujavimais arba tokiems ligoniams atliekant chirurgines operacijas, nes izoimunizacija gali sukelti nepakantumą pakartotinoms trombocitų transfuzijoms. Gleivinės kraujavimo dėl sunkios trombocitopenijos atvejais gali padėti peroralinis arba intraveninis antifibrinolitinių agentų panaudojimas. Tačiau ligoniams su išsėtine intravaskuliarine koaguliacija (DIC) antifibrinolitinių agentų naudojimas gali sukelti trombinės komplikacijas.

(b) Trombocitopenija dėl trombocitų kaupimosi
blužnyje

Splenomegalija, nepriklausomai nuo ją sukėlusios
priežasties, gali būti susijusi su silpna arba vidutine
5 trombocitopenija. Tai didžia dalimi yra pasyvus procesas
(hipersplenizmas), kai blužnyje sulaikomi trombo-
citai ir šis procesas kardinaliai skiriasi nuo akty-
viosios trombocitų destruktijos blužnyje, kuri vyksta
imuninių reakcijų sukeltos trombocitopenijos metu (žr.
10 žemiau). Dažniausia hipersplenizmo priežastis yra
splenomegalija, kilusi dėl alkoholinės cirozės, tačiau
ir kitos stazinės, infiltracinės ar limfoproliferacinės
splenomegalijos formos taip pat susijusios su trombo-
citopenija. Trombocitų kiekis paprastai būna mažesnis
15 nei 50×10^9 litre, jei trombocitopenija kilo dėl hiper-
splenizmo.

(c) Trombocitopenija dėl neimuninės trombocitų
destruktijos.

Trombocitopenijos priežastimi gali būti pagrei-
20 tinta trombocitų destruktija, sukelta įvairių neimu-
ninių procesų. Tokio tipo sutrikimams priklauso išsė-
tinė intravaskulinė koaguliacija, intravaskulinis
protezavimas, ekstrakorporinė kraujo cirkuliacija,
trombinės mikroangiopatijos, pvz., trombinė trombo-
25 citinė purpura. Visais šiais atvejais cirkuliuojantys
trombocitai kontaktuoja su dirbtiniu paviršiumi arba su
pažeista kraujagyslių sienele, yra šiose vietose pažei-
džiami ir anksčiau laiko pašalinami iš cirkuliacijos
retikuloendotelinės sistemos pagalba. Ligos ir sutri-
30 kimai, kuriems būdinga išsėtinė intravaskulinė koagu-
liacija (DIC) detalčiai aprašyti Braunwald et al.,
(eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine,
11th Ed., p. 1478, McGraw Hill [1987]. Intravaskuliniai
protezai, tarp jų širdies vožtuvai ir intraaortiniai
35 pripučiami kateteriai gali sukelti silpną arba destruk-

cinę trombocitopeniją. Laikinoji trombocitopenija gali atsirasti pacientams, kuriems atliekama ekstrakorporinė kraujo cirkuliacija arba hemodializė, dėl trombocitų praradimo arba jų pažeidimo ekstrakorporinėje kraujo apytakos ciklo dalyje.

(d) Vaistų indukuota imuninė trombocitopenija

Daugiau kaip 100 medikamentų gali sukelti imuninę trombocitopeniją. Tačiau gerai charakterizuotas tik kelių vaistų poveikis. Tai guanidinas, guaninas, auksas, sulfonilamidai, cefalotinas ir heparinas. Vaistų sukelta trombocitopenija dažnai būna labai ūmi ir paprastai išsivysto greitai, po kelių dienų nuo sensibilizuojančio gydymo pradžios.

(e) Imuninė (autoimuninė) trombocitopenija purpura (ITP)

Suaugusiems ITP yra chroniškas susirgimas, charakterizuojamas autoimunine trombocitų destrukcija. Autoantikūnai paprastai būna IgG klasės, kitų klasių antikūnų buvimas taip pat aprašytas literatūroje. Nors autoantikūnai siejami su trombocitų membranos GPII_bIII_a, tikslus autoantikūnų specifiškumas daugeliu atvejų neidentifikuotas. Ekstravaskulinė sensibilizuotų trombocitų destrukcija vyksta blužnies ir kepenų retikulo-endotelinėje sistemoje. Nors apie pusė ITP atvejų yra idiopatiniai, daug tokių pacientų serga reumatinėmis, autoimuninėmis ligomis (pvz., sisteminė raudonąja vilklige) arba limfoproliferaciniais susirgimais (pvz., lėtine limfocitine leukemija).

(f) ŽIV sukelta ITP

ITP vis dažniau pasireiškia kaip ŽIV infekcijos komplikacija (Morris et al., *Ann. Intern. Med.*, 96:714-717 [1982]) ir gali atsirasti bet kurioje ligos stadijoje, tiek pacientams su diagnozuotu AIDS, ar AIDS-asocijuotų simptomų kompleksu, tiek ir ŽIV nešiotojams be AIDS simptomų. ŽIV infekcija sukelia ligą, charakterizuojamą dideliu ląstelinio imuniteto defi-

citu, o taip pat oportunistinių infekcijų bei navikų buvimu. Pirminis imunologinis pažeidimas ŽIV infekcijos metu yra progresuojantis T-limfocitų, ekspresuojančių CD4 glikoproteiną, kiekio bei funkcijos nepakankamumas
5 (Lane et al., *Ann. Rev. Immunol.*, **3**:447 [1985]). Šis funkcionalių CD4 T-helperių praradimas greičiausiai ir yra ta priežastis, dėl kurios kyla dideli ląstelinio bei humoralinio imuniteto sutrikimai, pasireiškiantys AIDS būdingomis oportunistinėmis infekcijomis ir
10 navikais (H. Lane *supra*).

Nors ŽIV-asocijuotos ITP mechanizmas nežinomas, manoma, kad jis skiriasi nuo kitų, nesusijusių su ŽIV infekcija, ITP mechanizmų (Walsh et al., *N. Eng. J. Med.*, **311**:635-639 [1984]; Ratner, *Am J. Med.*, **86**:194-
15 198 [1989]).

IV Šiuolaikinė trombocitopenijos terapija

Pacientų su trombocitopenija terapijos būdo pasirinkimą apsprendžia konkreti klinikinė situacija.
20 ŽIV-asocijuotos ir neasocijuotos trombocitopenijos gydymo būdai yra panašūs. Buvo išbandyti keli terapijos būdai, bet gydymo eiga vis dar tebėra ginčytina.

Trombocitų kiekį pacientams su trombocitopenija pavyksta padidinti, gydant gliukokortikoidais (pvz.,
25 prednizolonu), tačiau daugeliui pacientų trombocitų kiekis visiškai neatsistato. Be to, kai gliukokortikoido dozė sumažinama arba vaistų vartojimas nutraukiamas, dažnai stebimas ligos recidyvas. Kai kurie ŽIV-asocijuotų ITP tyrimai leidžia daryti prielaidą, kad
30 gliukokortikoidų terapija gali sukelti predispoziciją AIDS. Paprastai gliukokortikoidai skiriami, kai trombocitų kiekis sumažėja iki 20×10^9 litre, arba kai vyksta spontaninis kraujavimas.

Keliais sunkios ne ŽIV-asocijuotos ITP atvejais, kai gydymas gliukokortikoidais pasirodė neefektyvus, buvo sėkmingai panaudotas junginys:

4-(2-chlorfenil)-9-(metil-2[3-(4-morfolinil)-3-propropanon-1-il]6H-tieno[3,2,f][1,2,4]triazolo [4,3,a][1,4]diazepinas (WEB 2086).

Pacientas, kurio trombocitų kiekis gydymo pradžioje buvo 37000-58000 ląstelių 1 μ l, buvo gydomas WEB 2086. Po vienos - dviejų savaičių gydymo trombocitų kiekis padidėjo iki 140000-190000 ląstelių 1 μ l. (EP 361,077 ir Lohman et al., *Lancet*, 1147 [1988]).

Nors optimali įgytos amegakariocitinės trombocitopenijos purpura (AATP) gydymo schema dar nesurasta, buvo parodyta, kad antitimocitinis globulinas ATG (arklio antiserumas prieš žmogaus čiobrialiaukės audinį) sukelia visišką ilgalaikę remisiją. (Trimble et al., *Am. J. Hematol.*, 37:126-127 [1991]). Nauji tyrimai rodo, kad hemopoetinis ATG efektas priskirtinas mertiolatui, kur baltymas veikia kaip gyvsidabrio pernešėjas (Panella et al., *Cancer Research*, 50: 4429-4435 [1990]).

Geri rezultatai buvo pasiekti, atliekant blužnies pašalinimą. Daugumai splenektomija pašalina svarbiausią trombocitų destrukcijos vietą ir svarbiausią autoantikūnų produkcijos šaltinį. Dažniausias šios procedūros rezultatas yra ilgalaikė remisija, kurios metu pacientams nereikia vartoti jokių medikamentų. Chirurginė intervencija nepageidautina, kai paciento imunitetas yra susilpnėjęs, todėl splenektomija rekomenduojama tik labai sunkiais trombocitopenijos atvejais (pvz., sunki ŽIV-asocijuota ITP) ir tik tokiems pacientams, kuriems 2 -3 savaičių kortikoidų terapija nepadeda arba kurių būklė vėl pablogėja, nutraukus gliukokortikoido vartojimą. Šiuolaikinis mokslinių žinių lygis neleidžia

tvirtinti arba paneigti, kad splenektomija turi poveikį AIDS predispozicijai.

Be prednizolono terapijos ir splenektomijos, gydant ŽIV-asocijuotos ITP, gauti neblogi preliminarūs rezultatai, naudojant kai kuriuos citotoksinius agentus, pvz., vinkristiną ir azidotimidiną (AZT, zidovudiną).

Vienas perspektyviausių būdų trombocitopenijai gydyti galėtų būti agentas, kuris pagreitintų megakariocitų arba jų pirmtakų diferenciaciją ir brendimą. Tokio agento, paprastai vadinamo trombopoetinu (TPO), atradimui skirta nemažai pastangų. Kiti literatūroje sutinkami TPO pavadinimai: trombocitopoezę stimuliuojantis faktorius (TSF), megakariocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (MK-CSF), megakariocitus stimuliuojantis faktorius ir megakariocitų potenciatorius. Pirmą kartą TPO aktyvumas buvo pastebėtas 1959 metais (Rak et al., *Med. Exp.*, 1:125), bet pastangos šį agentą išgryninti ir charakterizuoti tęsiasi iki šiol. Vienuose darbuose skelbiama apie TPO aktyvumą turinčių polipeptidų dalinį išgryninimą (žiūr., pvz., Tayrien et al., *J. Biol. Chem.*, 262: 3262 [1987] ir Hoffman et al., *J. Clin. Invest.*, 75:1174 [1985]), kituose - teigiama, kad TPO nėra atskiras savarankiškas baltymas, o tik vienas iš žinomo polifunkcionalaus hormono (IL-3) aktyvumų (Sparrow et al., *Prog. Clin. Biol. Res.*, 215:123 [1986]). Nepriklausomai nuo savo formos ar kilmės, molekulė, turinti trombopoetinį aktyvumą, turėtų didelę terapinę reikšmę. Nors, iki šiol nėra vienas baltymas nebuvo tiksliai identifikuotas kaip TPO, didelį susidomėjimą sukelia atradimas, kad *mpl* (hipotetinio citokino receptorius) gali vykdyti trombopoetinio signalo perdavimą.

V. Mpl yra megakariocitopoetinio citokino receptorius

Manoma, kad hemapoetinių ląstelių proliferacija ir brendimas griežtai reguliuojami faktoriais, kurie teigiamai ar neigiamai moduliuoja pliuripotentinės kamieninės ląstelės proliferaciją ir diferenciaciją. Šie efektai pasiekiami ekstraląsteliniais baltyminiais faktoriais susirišus su didelio afiniškumo ląstelių paviršiaus receptoriais. Minimi ląstelių paviršiaus receptoriai turi didelę tarpusavio homologiją ir klasifikuojami kaip citokinių receptorių superšeimos nariai. Į šią superšeimą įeina šių citokinių receptoriai: IL-2 (β ir γ grandinės) (Hatakeyama et al., *Science*, **244**:551-556 [1989]; Takeshita et al., *Science*, **257**:379-382 [1991]), IL-3 (Itoh et al., *Science*, **247**:324-328 [1990]; Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5459-5463 [1990]; Kitamura et al., *Cell*, **66**:1165-1174 [1991a]; Kitamura et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5082-5086 [1991b]), IL-4 (Mosley et al., *Cell*, **59**: 335-348 [1989]), IL-5 (Takaki et al., *EMBO J.*, **9**: 4367-4374 [1990]; Tavernier et al., *Cell*, **66**: 1175-1184 [1991]), IL-6 (Yamasaki et al., *Science*, **241**:825-828 [1988]; Hibi et al., *Cell*, **63**: 1149-1157 [1990]), IL-7 (Goodwin et al., *Cell*, **60**:941-951 [1990]), IL-9 (Renault et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5690-5694 [1992]), granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančiam faktoriui (GM-CSF) (Gearing et al., *EMBO J.*, **8**: 3667-3676 [1991]; Hayashida et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **244**: 9655-9659 [1990]), granulocitų kolonijas stimuliuojančiam faktoriui (G-CSF) (Fukunaga et al., *Cell*, **61**: 341-350 [1990a]); Fukunaga et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8702-8706 [1990b]); Larsen et al., *J. Exp. Med.*, **172**: 1559-1570 [1990]), EPO (D'Andrea et al., *Cell*, **57**:277-285 [1989]; Jones et al., *Blood*, **76**:31-35

[1990]), leukemijos inhibicijos faktoriui (LIF) (Gearing et al., *EMBO J.*, 10:2839-2848 [1991]), onkostatiniui M (OSM) (Rose et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8641-78645 [1991]), o taip pat receptoriams
5 prolaktinui (Boutin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7744-7748 [1988]; Edery et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2112-2116 [1989]), augimo hormonui (GH) (Leung et al., *Nature*, 330:537-543 [1987]) ir ciliariniam neurotropiniam faktoriui (CNTF) (Davis et al.,
10 *Science*, 253:59-63 [1991]).

Citokinių superšeimos narius galima sugrupuoti į tris funkcines kategorijas (apžvalga pateikta Nicola et al., *Cell*, 67:1-4 [1991]). Pirmąją klasę sudaro viengrandžiai receptoriai, pvz. eritropoetino receptorius
15 (EPO-R) ir granuliocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus receptorius (G-CSF-R); šie receptoriai apima ligandą su dideliu afiniškumu per savo ekstralastelinį domeną ir generuoja vidulastelinį signalą. Antroji receptorių klasė, vadinama α -subvienetais, jungia inter-
20 leukino-6 receptorių (IL6-R), granuliocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus receptorių (GM-CSF-R), interleukino-3 receptorių (IL3-R) ir kitus citokinių receptorių superšeimos narius. α -Subvienetai gali prisijungti ligandą su nedideliu afiniškumu, tačiau perduoti vidulastelinio signalo nesugeba. Didelio
25 afiniškumo receptoriai, sugebantys perduoti signalą, atsiranda, kai α -subvienetai susijungia į heterodimerą su trečiosios klasės citokinių receptoriais, vadinamais β -subvienetais; tokio receptoriaus pavyzdys yra β_c ,
30 kuris sudaro heterodimerus su IL3-R $_\alpha$ ir GM-CSF-R α -subvienetais.

Įrodymai, kad *mpl* yra citokinių receptorių superšeimos narys kyla iš struktūros homologijos (Gearing, *EMBO J.*, 8:3667-3676 [1988]; Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6834-6938 [1990]; Davis et al., *Science*,
35

253:59-63 [1991] ir Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5640-5644 [1992]) ir iš jo sugebėjimo perduoti proliferacijos signalą.

Baltymo amino rūgščių liekanų seka, nustatyta iš klonuoto pelių *c-mpl* geno įrodo, kad šis baltymas homologiškas kitiems citokinų receptoriams. Ekstralastelinis domenas sudarytas iš 465 amino rūgščių liekanų ir susideda iš dviejų subdomenų, kiekvienas subdomenas turi keturias konservatyvias cisteino liekanas ir ypatingą motyvą domeno C ir N galuose. Spėjama, kad ligandą rišantys ekstralasteliniai domenai turi panašią dvigubą cilindrinę β klosčių erdvinę struktūrą. Šis dublikuotas ekstralastelinis domenas turi didelę homologiją su signalą perduodančią grandinę, bendrą IL-3, IL-5 ir GM-CSF receptoriams, o taip pat su LIF mažo afiniškumo receptoriaus ligandą rišančių domenų (Vigon et al., *Oncogene*, 8:2607-2615 [1993]). Tokiu būdu, *mpl* gali priklausyti mažo afiniškumo ligandą rišančiai citokinų receptorių klasei.

Pelių *mpl* ir žmogaus *mpl* P palyginimas parodė, kad šios baltymų sekos yra identiškos 81 %. Konkrečiau, N galo ekstralasteliniai domenai identiški 75 %, o C galo identiškumas yra 80 %. Labiausiai konservatyvi *mpl* dalis yra citoplazminis domenas, turintis net 91 % identiškų amino rūgščių liekanų, o esantys šalia transmembraninio domeno 37 amino rūgščių liekanų peptidai yra visiškai identiški. Atitinkamai, *mpl* yra vienas iš labiausiai konservatyvių citokinų receptorių superšeimos narių (Vigon, *supra*).

Įrodymai, kad *mpl* yra funkcionalus receptorių, galintis perduoti proliferacijos signalą, buvo gauti tiriant chimerinius receptorių, susidedančius iš žinomo specifiškumo didelio afiniškumo citokino receptoriaus ekstralastelinio domeno ir *mpl* citoplazminio domeno. Kadangi tikrasis *mpl* ligandas nežinomas, rei-

kėjo sukonstruoti chimerinį didelio afiniškumo ligan-
dui specifišką ekstralastelinį domeną iš pirmosios
klasės citokino receptoriaus, tokio kaip IL-4R arba G-
CSFR. Vigon *et al.*, *supra*, suliejo G-CSFR ekstralaste-
5 linį domeną su transmembraniniu ir citoplazminiu *c-mpl*
domenais. IL-3 priklausoma ląstelių linija BAF/BO3
(Ba/F3) buvo transfekuota su G-CSFR/*mpl* chimera ir,
lygiagrečiai, kaip kontrolė, su pilnu G-CSFR genu.
Transfekuotos chimerine konstrukcija ląstelės vienodai
10 gerai augo terpėje su IL-3 arba G-CSF. Taip pat elgėsi
ir kontrolinės ląstelės, transfekuotos G-CSFR. Visos
ląstelės žūdavo be augimo faktorių. Analogiškas ekspe-
rimentas buvo atliktas Skoda *et al.*, *EMBO J.*, **12**(7):
2645-2653 [1993], jie sujungė žmogaus IL-4R receptorių
15 (hIL-4R) ekstralastelinį ir transmembraninį domeną su
pelio *mpl* citoplazminiu domenu ir tokia chimerine
konstrukcija transformavo pelio nuo IL-3 priklausomą
ląstelių liniją Ba/F3. Ba/F3 ląstelės, transfekuotos
chimeriniu laukinio tipo hIL-4R genu, normaliai dau-
20 ginosi esant terpėje IL-3 arba IL-4. Ba/F3 ląstelės
transfekuotos chimeriniu hIL-4R/*mpl*, taip pat normaliai
proliferavo terpėje, esant hIL-4 (su ir be IL-3). Tai
įrodo, kad Ba/F3 ląstelėse *mpl* citoplazminis domenas
turi visus elementus, reikalingus proliferacijos signa-
25 lo perdavimui.

Šie eksperimentai su chimeriniais receptoriais
įrodo, kad *mpl* citoplazminis domenas gali perduoti
signalą, tačiau jie neatsako į klausimą, ar gali *mpl*
ekstralastelinis domenas rišti kokį nors ligandą.
30 Turimi duomenys neprieštarauja dviem galimybėm: 1) *mpl*
yra viengrandis pirmosios klasės receptorių, kaip EPO-
R arba G-CSFR; 2) *mpl* yra signalą perduodantis β sub-
vienetas (trečioji klasė), kuriam reikalingas α sub-
vienetas panašus į IL-3 (Skoda, *supra*).

VI. *Mpl* ligandas yra trombopoetinas (TPO)

Buvo manyta (žiūr aukščiau), kad serume yra unikalus faktorius, vadinamas trombopoetinu (TPO), kuris, veikiant sinergetiškai su kitais citokinais, paspartina megakariocitų augimą ir brendimą. Tačiau toks faktorius dar niekad nebuvo išskirtas iš jokio natūralaus šaltinio, nepaisant didelių daugelio mokslinių grupių pastangų. Dar nežinoma, ar *mpl* gali tiesiogiai rišti megakariocitus stimuliuojantį faktorių; neseniai buvo eksperimentiškai parodyta, kad *mpl* dalyvauja perduodant signalą, gautą iš faktoriaus (ar faktorių), rastų pacientų su aplastiniais kaulų čiulpais serume (Methia et al., *Blood*, 82(5): 1395-1401 [1993]).

Įrodymus, kad serume egzistuoja unikalūs kolonijas formuojantis faktorius, skirtingas nuo IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, SCF, EPO, G-CSF ir GM-CSF, ir perduodantis proliferacijos signalą per *mpl*, suteikia *c-mpl* geno ekspresijos primityviuose ir komituotuose hemopoetinių ląstelių linijose tyrimai, bei *mpl* antisensinės DNR poveikio vienai tokių ląstelių linijų tyrimai.

Naudodami atvirkštinės transkriptazės (RT)-PCR analizę ir imunologiniais metodais frakcionuotas hemopoetinėse ląsteles, Methia ir kt. (cituota aukščiau) parodė, kad intensyvi *mpl* informacinės RNR sintezė vyksta tik CD34⁺ ląstelėse, megakariocituose ir trombocituose. CD34⁺ ląstelės išskirtos iš kaulų čiulpų, kur jos sudaro apie 1 % visų ląstelių. Tarp CD34⁺ ląstelių gausu primityvių ir komituotų visų atšakų ląstelių-pirmtakų (pvz., eritroidinės, granulomakrofaginės bei megakariocitinės atšakų pirmtakų).

Mpl antisensiniai oligodezoksinukleotidai supresuoja megakariocitų kolonijų formavimąsi iš pliuripotentinių CD34⁺ ląstelių, auginamų serume, paimtame iš pacientų su aplastiniais kaulų čiulpais, (toks serumas yra turtingas megakariocitų kolonijas stimuliuojančio

aktyvumo [MK-CSA] šaltinis). Tie patys antisensiniai oligodezoksinukleotidai neturi jokio poveikio eritroidinių ar granulomakrofaginių kolonijų formavimuisi.

Dar neišaiškinta, ar *mpl* tiesiogiai riša ligandą ir ar seruminis faktorius, kuris iššaukia megakariocitopoezę, veikia tikrai per *mpl*. Buvo spėjama, kad, jei *mpl* tikrai tiesiogiai riša ligandą, tai jo amino rūgščių liekanų seka turėtų būti labai konservatyvi ir turėtų vykti kryžminė reakcija tarp pelių ir žmogaus *mpl* dėl jų ekstralastelinių domenų sekų identiškumo (Vigon, et al., supra [1993]).

VII. Tikslas

Įvertinant perspektyvą, šioje mokslo srityje jaučiamas poreikis išskirti ir identifikuoti molekules, sugebančias stimuliuoti hemopoetinių ląstelių, ypač megakariocitų ir jų pirmtakų, proliferaciją ir brendimą, tam, kad būtų galima naudoti šias medžiagas terapijai, gydant trombocitopeniją. Manoma, kad tokios molekulės yra *mpl* ligandas ir todėl toliau reikalinga toki (tokius) ligandą (ligandus) išskirti ir įvertinti jo (jų) vaidmenį ląstelių augime ir diferenciacijoje.

Taigi, šio išradimo tikslas yra gauti farmaciškai švarias molekules, sugebančias stimuliuoti megakariocitų proliferaciją, diferenciaciją ir/arba brendimą į subrendusią trombocitus produkuojančią formą.

Kitas išradimo tikslas yra šias molekules pateikti taip, kad juos galima būtų naudoti terapijos tikslams, gydant hemopoetinius sutrikimus, ypač trombocitopeniją.

Toliau, šio išradimo tikslas yra išskyrimas, išgryninimas ir specifinis identifikavimas baltyminių ligandų, sugebančių *in vivo* susirišti su citokinų superšeimos receptoriumi, žinomu kaip *mpl*, ir perduoti per jį proliferacijos signalą.

Dar vienas išradimo tikslas yra gauti nukleino rūgščių molekules, koduojančias tokius baltyminius ligandus ir jas panaudoti *mpl*-rišančių ligandų produkcijai rekombinantinių ląstelių kultūroje diagnostikos ir terapijos tikslams.

Dar vienas išradimo tikslas yra pagaminti šių baltyminių ligandų darinius ir modifikuotas formas, įskaitant ir variantus su amino rūgščių liekanų pakeitimais sekoje, įvairiai glikozilintas ligando formas ir jų kovalentinius darinius.

Papildomas išradimo tikslas yra paruošti hibridinės *mpl* ligando formas, suliejant šį polipeptidą su heterologiniu baltymu ir kovalentiniais dariniais.

Dar vienas išradimo tikslas yra pagaminti pakeistas polipeptido formas, kuriose *mpl* ligandas būtų papildytas arba iš dalies pakeistas EPO sekomis, siekiant gauti baltymą, galintį reguliuoti ir trombocitų, ir eritocitų pirmtakų proliferaciją ir augimą.

Dar vienas papildomas išradimo tikslas yra paruošti imunogenišką *mpl* ligandą arba jo sulietas formas ir gauti antikūnus, specifinius minėtiems ligandams.

Šie ir kiti išradimo tikslai bus aiškūs specialistui, jei jis laikysis viso išradimo aprašymo.

25

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimo tikslai pasiekti, pateikus išskirtą žinduolių megakariocitų proliferaciją ir brendimą skatinantį baltymą, pavadintą "*mpl* ligandu" (ML) arba "trombopoetinu" (TPO), kuris sugeba stimuliuoti megakariocitų proliferaciją, brendimą ir diferenciaciją į subrendusią trombocitus produkujančią formą.

Šį homogenišką baltymą galima išgryninti iš natūralių šaltinių būdais, susidedančiais iš šių stadijų: (1) Plazmai, turinčiai *mpl* ligando molekulių, kurias reikia išgryninti, leidžiama sąveikauti su *mpl* ligandu, imobilizuotu receptoriaus polipeptidu, arba *mpl* hibri-

diniu polipeptidu, imobilizuotu ant nešiklio. Sąveikos sąlygos parinktos taip, kad gryninamo *mpl* ligando molekulės selektyviai sorbuojasi ant imobilizuoto receptoriaus polipeptido. (2) Sorbentas su imobilizuotu receptoriumi praplaunamas, siekiant pašalinti visas medžiagas, kurios nesusirišo su sorbentu. (3) Eliucijos buferiniu tirpalu *mpl* ligando molekulės eliujuojamos nuo imobilizuoto receptorinio polipeptido, prie kurio jos buvo prisijungusios. Geriausias natūralus šaltinis yra žinduolių plazma arba šlapimas, turintys *mpl* ligando. Pageidautina, kad žinduolis būtų aplastinis, o imobilizuotas receptorius būtų *mpl*-IgG hibridinis polipeptidas.

Pirmenybė teikiama megakariocitopoetinę proliferaciją ir brendimą skatinančiam baltymui, kuris yra išgrynintas, praktiškai homogeniškas *mpl* ligando polipeptidas, pagamintas sintetiniu arba genoinžinieriniu būdu.

Šiame išradime aprašytas "*mpl* ligando" polipeptidas arba "TPO", kurio amino rūgščių liekanų seka yra 70 % homologiška išgrynintam praktiškai homogeniniam kiaulių *mpl* ligando polipeptido sekai ir mažiausiai 80 % identiška kiaulių *mpl* ligando polipeptido "EPO-domenui". Šiame išradime pateikiamas *mpl* ligandas yra subrendęs žmogaus *mpl* ligandas (hML), kurio seka pateikta Fig. 1 (SEQ ID Nr. 1), arba po transkripcijos modifikuotas šio polipeptido variantas, kurio seka 80 % identiška subrendusiems žmogaus *mpl* ligandui. Šis *mpl* ligando variantas yra žmogaus subrendusio *mpl* ligando (hML) fragmentas, konkrečiai "EPO-domeno N galas". Šis N baltymo gale esantis fragmentas būtinai turi turėti pilną žmogaus ML amino rūgščių liekanų seką nuo 1 iki 4 cisteino, bet už šios srities ribų gali turėti žymius amino rūgščių liekanų pakeitimus, delecijas ir intarpus Pagal šį variantą

fragmentinis polipeptidas gali būti pavaizduotas formule:

X-hML(7-151)-Y, kurioje

hML(7-151) atitinka žmogaus TPO (hML) amino rūgščių
5 liekanų seka nuo Cys⁷ iki Cys¹⁵¹ imtinai; X yra Cys⁷
amino grupė arba vienos ar kelių N galo amino rūgščių
liekanos, prijungtos prie subrendusio hML sekos arba
amino rūgščių liekanų papildymas, pvz., Met, Tyr, arba
lyderinės sekos, turinčios, pvz., proteolitinio skėlimo
10 vietą (pvz., faktorius Xa ar trombinas); Y - Cys¹⁵¹
galinė karboksilinė grupė arba viena ar kelios C galo
amino rūgščių liekanos iš subrendusio hML sekos, arba
šios sekos papildymas kitomis amino rūgščių liekanomis.

Mpl ligandas arba jo fragmentas gali būti sulie-
15 jami su heterologiniu polipeptidu ir sudaryti hibri-
dines (chimerines) molekules. Geriausiai tinkantys
heterologiniai polipeptidai yra citokinai, kolonijas
stimuliuojantys faktoriai, interleukinai, ar jų frag-
mentai, ypač kit-ligandas (KL), IL-1, IL-3, IL-6, IL-
20 11, EPO, GM-CSF arba LIF. Geriausias heterologinis
polipeptidas yra imunoglobulinų grandinė, t. y., žmo-
gaus IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, IgM arba jų
fragmentai, ypač tie, kurie sudaro IgG sunkiosios
grandinės pastoviuosius domenų.

25 Kitas šio išradimo aspektas apima kompoziciją,
turinčią išskirtą *mpl* agonistą, kuris yra biologiškai
aktyvus ir gali stimuliuoti žymėtų nukleotidų (pvz.,
³H-timidino) įsijungimą į IL-3 priklausomų Ba/F3 ląste-
lių, transfekuotų žmogaus *mpl* geno, DNR. *Mpl* agonistas
30 gali būti ne kas kitas, kaip aktyvus *mpl* ligandas,
sugebantis stimuliuoti ³⁵S įsijungimą į cirkuliuojan-
čius trombocitus, kaip nustatyta pelių atsakomosios
trombocitozės medodu. Tinkami *mpl* agonistai : hML₁₅₃,
hML(R153A,R154A), hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3,
35 pML ir pML2 arba jų fragmentai.

Kita šio išradimo dalis apima išskirtus antikūnus, surišančius *mpl* ligandą. Tokie antikūnai arba tokių antikūnų chimeros su kitais polipeptidais gali būti panaudoti *mpl* ligando išskyrimui bei išgryninimui iš ligando šaltinio, kaip aprašyta aukščiau, su imobilizuotu *mpl*. Toliau šiame išradime pateiktas *mpl* ligando nustatymo būdas *in vitro* ir *in vivo*. Būdas pagrįstas antikūnų sąveika su pavyzdyje, ypač serume, esančiu ligandu ir susidariusio komplekso detekcija.

10 Dar kitoje išradimo dalyje pateikta išskirta nukleino rūgšties molekulė, koduojanti *mpl* ligandą ar jo fragmentą. Ši molekulė gali būti pažymėta detektuojama žyme ir panaudota hibridizacijai (vidutinėse ir griežtose sąlygose) su nukleino rūgšties molekule, turinčia sekas, komplementarias *mpl* ligandą koduojančiai sekai. Pirmiausia tai nukleino rūgščių molekulės, koduojančios žmogaus, kiaulės ir pelės *mpl* ligandus; tai gali būti RNR ir DNR, tiek genominė DNR, tiek ir kDNR. Tolesnis šios dalies aspektas apima DNR molekulę, 20 koduojančią *mpl* ligandą ir įkonstruotą į replikacijos vektorių, kuriame šis DNR fragmentas prijungtas prie kontrolinių sekų, kurias atpažįsta vektoriumi transformuotos ląstelės-šeimininkai. Tinkamiausia DNR yra kDNR, kurios seka pateikta Fig. 1 5' -3' (SEQ ID Nr. 2), 3'- 25 5' ar jos fragmentas. Toliau į šį aspektą įtraukiamos ląstelės-šeimininkai (geriausiai tinkamos CHO ląstelės, transformuotos minėtu vektoriumi), o taip pat DNR panaudojimo būdas, stimuliuojantis *mpl* ligando produkciją, sukeliant kDNR, koduojančios *mpl* ligandą, ekspresiją transformuotų ląstelių-šeimininkų kultūroje ir išskiriant *mpl* ligandą iš ląstelių šeimininkų arba kultivavimo terpių, kuriose šios ląstelės buvo auginamos.

Išradimas apima terapiškai efektyvių *mpl* ligando kiekių panaudojimą žinduolių, turinčių hemopoetinių sutrikimų, ypač trombocitopeniją, terapijai. Pasirin-

ktinai *mpl* ligandas gali būti suleidžiamas kartu su kitais citokinais, ypač su kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi ar interleukinu. Geriausi kolonijas stimuliuojantys faktoriai ar interleukinai yra šie: kit-
5 ligandas (KL), LIF, G-CSF, GM-CSF, *Mpl*-CSF, EPO, IL-1, IL-3, IL-6 ir IL-11.

Toliau išradime aprašomas TPO (ML) išskyrimo ir gryninimo iš TPO produkuojančių mikroorganizmų būdas, kuriame:

- (1) ląsteles, turinčias TPO, suardo arba lizuoja;
- (2) atskyria tirpias ir netirpias medžiagas, turinčias TPO;
- (3) TPO ištirpina iš netirpios medžiagos soliubilizuojančiu buferiniu tirpalu;
- (4) tirpų TPO išskiria iš kitų tirpių ir netirpių medžiagų;
- (5) TPO natyvią konformaciją atstato red-oks buferiniame tirpale;
- (6) taisyklingos konformacijos TPO molekulės atskiria nuo netaisyklingai susiformavusių molekulių.

10 Netirpaus TPO ištirpinimui naudojamas chaotropinis agentas, kuris pasirenkamas iš šių agentų: guanidino druskos, natrio tiocianato arba karbamido. Tolesnis pro- cesas yra soliubilizuoto TPO atskyrimas iš kitų tirpių bei netirpių medžiagų, naudojant vieną ar dau-
15 giau etapų, pasirenkamų iš: centrifūgavimo, gel-filtracijos ir atvirkščių fazių chromatografijos. Natyvios konformacijos atstatymas vykdomas red-oks buferiniame tirpale, kurio sudėtyje yra oksidatorius ir reduktorius. Dažniausiai oksiduojantis agentas yra deguonis
20 arba junginys, turintis mažiausiai vieną disulfidinę jungtį, o redukuojantis agentas yra junginys, turintis bent vieną laisvą sulfhidrilinę grupę. Oksiduojantis agentas pasirenkamas iš oksiduoto gliutatio (GSSG) ar

cistino, redukuojantis - iš redukuoto gliutatio (GSH) ir cisteino. Geriausias oksiduojantis agentas yra oksiduotas gliutatio (GSSG), o geriausias redukuojantis agentas - redukuotas gliutatio (GSH). Patartina, kad
5 oksiduojančio ir redukuojančio agentų molinis santykis būtų lygus ar didesnis už vieneta. Papildomai į red-oks buferinį tirpalą įeina detergentas, pasirenkamas iš CHAPS ir CHAPSO; jo koncentracija turi būti ne mažesnė kaip 1 %. Be to į red-oks buferinio tirpalo sudėtį
10 įeina 0,1 - 0,5 M NaCl ir 15 % ar daugiau glicerino. Red-oks buferinio tirpalo pH yra 7.5 - 9.0, konformacijos atstatymo procesas vykdomas 12 - 48 valandas 4°C temperatūroje. Po konformacijos atstatymo etapo gaunamas biologiškai aktyvus TPO, kuriame disulfidinė
15 jungtis yra sudaryta tarp Cys, esančio arčiausiai N baltymo galo ir Cys, esančio arčiausiai EPO domeno C galo.

Toliau išradimas apima būdą, skirtą biologiškai aktyvaus TPO išgryninimui iš mikroorganizmo. Šį būdą
20 vykdo taip:

- (1) lizuoja bent ekstraląstelinę mikroorganizmo membraną;
- (2) lizatą, kuriame yra TPO, apdoroja chaotropiniu agentu;
- (3) atstato TPO natyvią konformaciją; ir
- (4) atskiria piemišas bei netaisyklingos konformacijos TPO molekules.

TRUMPI FIGŪRŲ APRAŠYMAI

Fig. 1 pateikta žmogaus *mpl* ligando (hML) išvestinė amino rūgščių liekanų seka iš kDNR (SEQ ID Nr. 1) ir
25 koduojančių nukleotidų sekos (SEQ ID Nr. 2). Nukleotidai sunumeruoti nuo kiekvienos eilutės pradžios. 5' ir 3' netransliuojamos sritys pavaizduotos mažosiomis raidėmis. Amino rūgščių liekanų sekos sunumeruotos viršuje, pradedant nuo pirmosios subrendusio *mpl* ligando

(ML) amino rūgšties liekanos Ser. Spėjamo egzono 3 ribos pažymėtos rodyklėmis, galimos N-glikozilavimo vietos yra apibrėžtos. Cisteino liekanos yra pažymėtos tašku virš liekanos. *Mpl* ligando, išskirto iš kiaulės plazmos, nustatytas N galas yra pabrauktas.

Fig. 2 pavaizduota *mpl* ligando nustatymo procedūra pagal ^3H -timidino įsijungimą. Nustatant įvairiuose šaltiniuose *mpl* ligandą, *mpl* P Ba/F3 ląstelės auginamos be IL-3 24 valandas inkubatoriuje, prisotintame vandens garais, 37°C temperatūroje, paduodant orą su 5% CO₂. Po ląstelių auginimo be IL-3 ląstelės pernešamos į 96 šulinėlių audinių kultūrų plokšteles ir inkubuojamos 24 valandas su praskiestais mėginiais arba be jų. Paskutines 6-8 valandas į kiekvieną šulinėlį pridedama 20 μl beseruminės RPMI terpės su 1 μCi ^3H -timidino. Ląstelės surenkamos 96 šulinėlių filtruojamose plokštelėse ir praplaunamos vandeniu. Įvertinamas filtruose esantis radioaktyvumas.

20

Fig. 3 pavaizduota pronazės, DTT ir temperatūros įtaka APP sugebėjimui stimuliuoti Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferaciją. Skaldant APP, pronazė (Boehringer Mannheim) arba jaučio serumo albuminas imobilizuojami ant Affigel10 (Bio-Rad) ir inkubuojami atskirai su APP 18 valandų 37°C temperatūroje. Pašalinus sorbentus centrifūguojant, analizuojami supernatantai. APP kaitinamas 80°C temperatūroje 4 minutes arba pridedama 100 μM DTT ir dializuojama prieš PBS.

30

Fig. 4 pavaizduota *mpl* ligando eliucija iš Phenyl-Toyopearl, Blue-Sepharose ir Ultralink-*mpl* sorbentų. Pažymėtos frakcijos F4 -F8 (dižiausio aktyvumo frakcijos) yra surinktos desorbuojant nuo *mpl* afininės kolonėlės.

35

Fig. 5 pavaizduota frakcijų, desorbuotų nuo Ultralink-*mpl*, SDS-PAGE elektroforegrama. Į kiekvienos (2-8) frakcijos 200 µl pridedama 1 ml atšaldyto iki -20°C 1mM HCl tirpalo acetone. Išlaikius mėginius tris valandas
5 -20°C temperatūroje, centrifuguojama, nuosėdos praplau-
namos du kartus atšaldytu iki -20°C acetonu. Acetoninės
nuosėdos ištirpinamos 30 µl SDS buferiniame tirpale,
pridedama iki 100 µM DTT ir kaitinama 90°C temperatū-
roje 5 minutes. Atliekama mėginių SDS PAGE elektrofo-
10 rezė 4-20% koncentracijos poliakrilamidiniame gelyje,
po elektroforezės geliai dažomi sidabru.

Fig. 6 pavaizduotas *mpl* ligando eliucijos vaizdas iš
SDS-PAGE gelio. 6 frakcija nuo *mpl*-afininio sorbento
15 buvo analizuota 4-20% koncentracijos poliakrilamidi-
niame gelyje neredukuojančiomis sąlygomis. Po elektro-
forezės gelis buvo supjaustytas į 12 lygių dalių,
baltymas aprašytu pavyzdžiuose būdu buvo elektroeliu-
juojamas. Eliujuoti mėginiai buvo dializuojami prieš
20 PBS ir tiriami praskiedus 20 kartų. Buvo naudojami
Novex Mark 12 molekulinės masės standartai.

Fig. 7 pavaizduota *mpl* ligando įtaka žmogaus megaka-
riocitopoezės procesui. APP be *mpl* ligando paruošiama
25 praleidus 1 ml per 1 ml *mpl*-afininę kolonėlę (700 µg
mpl-IgG/ml NHS-Superose, Pharmacia). Į žmogaus peri-
ferinių kamieninių ląstelių kultūrą įdedama 10 % APP
arba 10 % APP be *mpl* ligando ir auginamos 12 dienų.
Megakariocitopoezės procesas kiekybiškai įvertinamas
30 pavyzdžiuose aprašytu būdu.

Fig. 8 pavaizduota *mpl*-IgG įtaka stimuliuojant žmogaus
megakariocitopoezės procesą APP. Į žmogaus periferinių
kamieninių ląstelių kultūrą įdedama 10 % APP ir augina-
35 mos 12 dienų. Pačioje pradžioje, antrą ir ketvirtą

kultivavimo dieną pridedama *mpl*-IgG (0,5 µg) arba ANP-R-IgG (0,5 µg). Po 12 dienų megakariocitopoezės procesas kiekybiškai įvertinamas pavyzdžiuose aprašytu būdu. Dviejų analizių vidurkiai pavaizduoti grafiškai,
5 skliaustuose nurodyti abiejų analizių rezultatai.

Fig. 9 pavaizduotas dvigrandis 390 bp žmogaus genominės DNR fragmentas, koduojantis *mpl* ligandą. Taip pat pateiktos išvestinė "egzono 3" amino rūgščių liekanų
10 seka (SEQ ID Nr. 3), koduojanti seka (SEQ ID Nr. 4) ir komplementari seka (SEQ ID Nr. 5).

Fig. 10 pavaizduotos išvestinė subrendusio *mpl* ligando (hML) amino rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 6) ir
15 subrendusio žmogaus eritropoetino (hEPO) išvestinė amino rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 7). Identiškos amino rūgščių liekanos yra apibėžtos, tam, kad būtų geriau parodyta amino rūgščių sekų homologija, amino rūgščių sekose palikti tarpai, kurie pažymėti punktyru.
20 Potencialios N-glikozilinimo vietos hML sekoje pažymėtos ištisine linija, o hEPO sekoje - punktyru. Dvi cisteino liekanos, svarbios eritropoetino aktyvumui, pažymėtos tašku.

25 **Fig. 11** pavaizduotos išvestinės subrendusių žmogaus *mpl* ligandų izoformų hML (SEQ ID Nr. 6), hML2 (SEQ ID Nr. 8), hML3 (SEQ ID Nr. 9) ir hML4 (SEQ ID Nr.: 10) amino rūgščių liekanų sekos. Identiškos amino rūgščių liekanos yra apibėžtos, tam, kad būtų geriau parodyta
30 amino rūgščių sekų homologija, amino rūgščių sekose palikti tarpai, kurie pažymėti punktyru.

Fig. 12A, 12B ir 12C pavaizduotas žmogaus *mpl* ligando poveikis Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferacijai (**A**), žmogaus
35 megakariocitopoezės procesas *in vitro* kiekybiškai

įvertintas naudojant žymėtus pelės monokloninius IgG antikūnus, specifinius megakariocitų glikoproteinui GPII_bIII_a (B) ir pelių trombopoezės procesas įvertintas atsakomosios trombocitozės metodu (C).

5 293 linijos ląstelės buvo transfekuotos vien pRK5 vektoriumi, pRK5-hML vektoriumi arba pRK5-ML₁₅₃ vektoriumi kalcio fosfatiniu metodu (Gorman, C. in *DNA Cloning: A New Approach* 2:143-190 [1985]) per naktį (pRK5-ML₁₅₃ vektorius buvo sukonstruotas įterpiant PCR
10 metodu stop kodoną po 153 hML baltymo amino rūgšties liekanos). Transformantai buvo auginami 36 valandas ir terpė, kurioje jie augo, buvo įvertinama nustatant: sugebėjimą stimuliuoti Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferaciją, kaip aprašyta Pavyzdyje 1 (A) arba sugebėjimą
15 stimuliuoti žmogaus megakariocitopozę *in vitro*, kaip aprašyta Pavyzdyje 1 (B). Megakariocitopozės procesas kiekybiškai buvo įvertinamas naudojant žymėtus ¹²⁵J pelės monokloninius IgG antikūnus (HP1-1D), prieš megakariocitų specifinį glikoproteiną GPII_bIII_a. Grant
20 et al., *Blood* 69:1334-1339 [1987] aprašytu būdu. Dalinai išgryninto rekombinantinio ML baltymo (rML) efektas trombocitų susidarymui *in vivo* (C) buvo įvertintas, naudojant atsakomosios trombocitozės metodą, kaip aprašyta McDonald, T.P. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*
25 144: 1006-10012 (1973). Dalinai išgrynintas rML buvo paruošiamas iš 200 ml kondicionuotos terpės, turinčios rekombinantinio ML. Terpė buvo gryninama per 2 ml tūrio Blue-Sepharose kolonėlę, nulygsvarintą PBS, kolonėlė praplaunama PBS ir sorbuoti baltymai buvo eliujuojami
30 PBS, pridėjus 2M karbamido ir 2M NaCl. Frakcijos, kuriose buvo nustatytas aktyvumas, buvo dializuojamos PBS ir pridedama iki 1 mg/ml koncentracijos BSA be endotoksinų. Taip paruoštuose preparato mėginiuose endotoksinų koncentracija buvo mažesnė, nei 1 vienetas
35 mililitre. Pelėms buvo suleidžiama 64000, 32000 arba

16000 rML vienetai arba vien tirpiklis. Kiekvieną grupę sudarė šešios pelės. Pateikti vidurkiai ir standartiniai nukrypimai kiekvienai grupei. p reikšmės buvo nustatytos T-analize, įvertinant reikšmių patikimumą.

5

Fig. 13 palygintas žmogaus *mpl* ligando izoformų ir variantų poveikis Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferacijai. hML, mock, hML2, hML3, hML(R153A, R154A) ir hML₁₅₃ įtaka buvo įvertinta įvairiuose preparatų praskiedimuose kaip
10 aprašyta Pavyzdyje 1.

Fig. 14A, 14B 14C, 14D ir 14E pavaizduotos išvestinė *mpl* ligando (hML) arba TPO (hTPO) amino rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 1) ir koduojanti žmogaus genominės DNR
15 seka (SEQ ID Nr. 11). Nukleotidų ir amino rūgščių liekanų numeriai nurodyti kiekvienos eilutės pradžioje.

Fig. 15 pateikta išgrynintų 293-rhML₃₃₂ ir 293-rhML₁₅₃ baltymų SDS-PAGE elektroforegrama.

20

Fig. 16 pateiktos koduojanti kDNR nukleotidų seka (SEQ ID Nr. 12) ir pelių ML baltymo izoformos išvestinė amino rūgščių liekanų seka, koduojama atviraime skaitymo rėmelyje, (SEQ ID Nr. 13). Ši subrendusio pelių *mpl*
25 ligando baltymo izoforma sudaryta iš 331 amino rūgščių liekanų, taigi, šis baltymas keturiomis amino rūgščių liekanomis trumpesnis, nei visas mML baltymas, todėl jis žymimas mML2. Nukleotidai sunumeruoti kiekvienos eilutės pradžioje. Amino rūgščių liekanos sunumeruotos
30 virš liekanų, pradedant nuo Ser 1. Potencialios N-glikozilavimo vietos yra pabrauktos. Cisteino liekanos pažymėtos tašku.

Fig. 17 pateiktos kDNR nukleotidų seka (SEQ ID Nr. 14)
35 ir išvestinė pelių ML baltymo izoformos (mML) amino

rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 15). Nukleotidų numeriai nurodyti kiekvienos eilutės pradžioje. Amino rūgščių liekanos sunumeruotos virš liekanų, pradedant nuo Ser 1. Ši subrendusio pelių *mpl* ligando baltymo izoforma sudaryta iš 335 amino rūgščių liekanų, tai yra pilno ilgio *mpl* ligando baltymas, žymimas mML. Signalinė seka yra pabraukta punktyru, spėjama skėlimo vieta pažymėta rodykle. 5' ir 3' netransliuojamos sritys pažymėtos mažosiomis raidėmis. Dvi delecijos vietos yra pbrauktos, baltymai, turintys šias delecijas, atsiradusias dėl alternatyvaus splaisingo, žymimi mML2 ir mML3. Keturios cisteino liekanos pažymėtos taškais. Septynios potencialios N-glikozilinimo vietos yra apibrauktos.

15 **Fig. 18** yra palygintos žmogaus ML baltymo izoformos hML3 (SEQ ID Nr. 9) ir pelės ML baltymo izoformos mML3 (SEQ ID Nr. 16) išvestinės amino rūgščių liekanų sekos. Išvestinė žmogaus *mpl* ligando baltymo amino rūgščių liekanų seka yra sulyginta su pelių *mpl* ligando baltymo seka. Identiškos amino rūgščių liekanos yra apibrauktos; tam, kad būtų geriau parodyta amino rūgščių sekų homologija, amino rūgščių sekose palikti tarpai, kurie pažymėti punktyru. Amino rūgščių liekanų numeracija yra kiekvienos eilutės pradžioje.

25

Fig. 19 yra palygintos subrendusių ML baltymo izoformos: pelės-ML (SEQ ID Nr. 17), kiaulės-ML (SEQ ID Nr. 18) ir žmogaus-ML (SEQ ID Nr. 6) sekos. Amino rūgščių liekanų sekose tam, kad būtų geriau parodyta amino rūgščių sekų homologija, palikti tarpai, kurie pažymėti punktyru. Amino rūgščių liekanų numeracija yra kiekvienos eilutės pradžioje, identiškos amino rūgščių liekanos yra apibrauktos. Potencialios N-glikozilinimo vietos yra apibrauktos, cisteino liekanos yra pažymėtos taškais. Konservatyvių dviejų bazinių amino rūgščių liekanų motyvas, nurodantis galimą proteinazių skėlimo

35

vieta, yra pabrauktas. Aptinkamos keturios delecijos vietos visuose trijuose baltymuose (ML2) yra užtušotos.

5 **Fig. 20** pateiktos kDNR nukleotidų seka (SEQ ID Nr. 19) ir išvestinė subrendusio kiaulės ML baltymo izoformos (pML) amino rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 18). Ši kiaulės *mpl* ligando baltymo izoforma sudaryta iš 332 amino rūgščių liekanų, tai yra pilnas subrendęs kiaulės
10 *mpl* ligando baltymas, žymimas pML. Nukleotidų numeriai nurodyti kiekvienos eilutės pradžioje. Amino rūgščių liekanos sunumeruotos viršuje, pradedant nuo Ser 1.

Fig. 21 pateiktos kDNR nukleotidų seka (SEQ ID Nr. 20)
15 ir išvestinė subrendusio kiaulės ML baltymo izoformos (pML2) amino rūgščių liekanų seka (SEQ ID Nr. 21). Ši kiaulės *mpl* ligando baltymo izoforma sudaryta iš 328 amino rūgščių liekanų, tai yra pilnas subrendęs kiaulės *mpl* ligando baltymas be keturių amino rūgščių liekanų,
20 žymimas pML2. Nukleotidų numeriai nurodyti kiekvienos eilutės pradžioje. Amino rūgščių liekanos sunumeruotos viršuje, pradedant nuo Ser 1.

Fig. 22 yra palygintos subrendusio kiaulės ML baltymo
25 izoformos pML (SEQ ID Nr. 18) ir kiaulės ML baltymo izoformos pML2 (SEQ ID Nr. 21) sekos. Išvestinė pML baltymo amino rūgščių liekanų seka yra sulyginta su pML2 baltymo seka. Identiškos amino rūgščių liekanos yra apibrauktos; lengvesniam palyginimui palikti pažymėti punktyru tarpai. Amino rūgščių liekanų numeriai
30 nurodyti kiekvienos eilutės pradžioje.

Fig. 23 yra pateikta plazmidės pSVI5.ID.LL.MLORF ("pilno ilgio" arba TPO₃₃₂) konstrukcija, šia plazmide

buvo transfekuojamos CHO-DP12 ląstelės CHO-rhTPO₃₃₂ produkcijai.

Fig. 24 yra pateikta plazmidės pSVI5.ID.LL.MLEPO-D ("sutrumpinto" arba TPO₁₅₃) konstrukcija, šia plazmide
5 buvo transfekuojamos CHO-DP12 ląstelės CHO-rhTPO₁₅₃ produkcijai.

Fig. 25A, 25B ir 25C pateiktas *E.coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153)
10 poveikis normalių pelių trombocitams (A), eritrocitams (B) ir leukocitams (C). Dviems C57 B6 linijos pelių patelių grupėms (po 6 pateles grupėje) buvo kasdien suleidžiama PBS buferinio tirpalo arba 0,3 μg *E.coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153) (100 μl, sc.) Prieš suleidžiant mėginius
15 (diena 0) ir nuo 3 iki 7 dienos kraujas buvo imamas po 40 μl iš pelių akiduobės sinuso. Paimtas kraujas buvo iškart praskiedžiamas 10 ml standartiniu skiedikliu ir atliekama pilna kraujo forminių elementų analizė Serrono Baker Hematology Analyzer 9018 aparatu. Duomenys pateikti, kaip vidurkiai ± standartinė paklaida.
20

Fig. 26A, 26B ir 26C pateiktas *E.coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153) poveikis subletalai apšvitintų pelių trombocitams (A), eritrocitams (B) ir leukocitams (C). Dviems C57 B6
25 linijos pelių grupėms (po 10 patelių grupėje), kurios buvo subletalai apšvitinamos 750 cGy galingumo gama spinduliais iš ¹³⁷Cs radiacijos šaltinio, kasdien buvo suleidžiama PBS buferinio tirpalo arba 0,3 μg *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153) (100 μl, sc.). Prieš suleidžiant mėginius
30 (diena 0) ir tam tikrais intervalais kraujas po 40 μl buvo imamas iš pelių akiduobės sinuso. Paimtas kraujas buvo iškart praskiedžiamas 10 ml standartiniu skiedikliu ir atliekama pilna kraujo forminių elementų analizė

Serrono Baker Hematology Analyzer 9018 aparatu. Duomenys pateikti, kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.

Fig. 27A, 27B ir 27C pateiktas CHO-rhTPO₃₃₂ poveikis
5 normalių pelių trombocitams (A), eritrocitams (B) ir
leukocitams (C). Dviems C57 B6 linijos pelių grupėms
(po 6 pateles grupėje) buvo kasdien suleidžiama PBS
buferinio tirpalo arba 0,3 μ g CHO-rhTPO₃₃₂ (100 μ l, sc.)
Prieš suleidžiant mėginius (diena 0) ir nuo 3 iki 7
10 dienos kraujas po 40 μ l buvo imamas iš pelių akiduobės
sinuso. Paimtas kraujas buvo iškart praskiedžiamas
10 ml standartiniu skiedikliu ir atliekama pilna kraujo
forminių elementų analizė Serrono Baker Hematology
Analyzer 9018 aparatu. Duomenys pateikti, kaip vidur-
15 kiai $\pm$ standartinė paklaida.

Fig. 28 pateiktos atsako į dozę kreivės įvairių rhTPO,
gautų iš įvairių ląstelių linijų. Pateiktos atsako
priklausomybės nuo dozės kreivės rhTPO iš šių ląstelių
20 linijų: hTPO₃₃₂ iš CHO (viso ilgio baltymas, išskirtas
iš Kinijos žiurkėnų kiaušidžių ląstelių), hTPO_{met}⁻¹ 153
(*E. coli* produktas sutrumpintas nuo N baltymo galo su
Met liekana N baltymo gale), hTPO₃₃₂ (pilnas TPO bal-
tymas, išskirtas iš žmogaus 293 linijos ląstelių), be
25 Met 155 *E. coli* (sutrumpintas [rhTPO₁₅₅] baltymas be
pirmos metionino liekanos, išskirtas iš *E. coli*).
Šešioms C57B6 linijos pelių patelių grupėms buvo
kasdien 7 dienas suleidžiami rhTPO preparatai. Kiek-
vieną dieną buvo paimama po 40 μ l kraujo iš pelių
30 akiduobės sinuso pilnai kraujo forminių elementų
analizei. Duomenyse, pateiktuose ankščiau, parodytas
maksimalus atsakas, kuris visuose bandymuose, išskyrus
Met153 *E-Coli*, buvo stebimas septintą tyrimų dieną.
Minėtoje "Met153 *E-Coli*" grupėje maksimalus efektas

buvo stebimas penktą tyrimų dieną. Duomenys pateikti, kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.

Fig. 29 pateiktos atsako kreivės lyginant pilno baltymo aktyvumą ir "sutrumpintų" rhTPO baltymo formų, išskirtų iš CHO ląstelių, aktyvumą su sutrumpintais baltymais, išskirtais iš *E. coli*. Šešioms C57B6 linijos pelių patelių grupėms buvo kasdien suleidžiami po 0,3 μ g įvairaus tipo rhTPO preparatai. Nuo 2 iki 7 dienos kas dieną buvo paimama po 40 μ l kraujo iš pelių akiduobės sinuso pilnai kraujo forminių elementų analizei. Buvo tirti šie preparatai: sutrumpintas TPO - TPO₁₅₃, išskirtas iš *E. coli*; TPO₃₃₂ (frakcijų mišinys) kuriame yra 80-90% viso ilgio TPO baltymo ir 10-20 % sutrumpintų šio baltymo formų; TPO₃₃₂ (30K frakcija) - išgrynintos iš "frakcijų mišinio" sutrumpintos formos; TPO₃₃₂ (70K frakcija) - išgrynintas iš frakcijų mišinio viso ilgio TPO baltymas. Duomenys pateikti kaip vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida.

20

Fig. 30 pavaizduotas TPO baltymo nustatymas KIRA ELISA analize. Paveikslėlyje pavaizduotos MPL/Rse.gD chimerinė molekulė ir atitinkamos pradinio receptoriaus dalys, taip pat ir galutinis kompleksas (dešinė paveikslėlio dalis) ir analizės diagrama, parodanti tiesiogines matavimo stadijas (kairė piešinėlio pusė).

Fig. 31 pateikta KIRA ELISA analizės eigos schema etapais.

30

Fig. 32A - 32Z-5 pateikta ekspresijos vektoriaus pSVI17.ID.LL, panaudoto Pavyzdyje 17 Rse.gD ekspresijai, nukleotidų seka (SEQ ID Nr. 22).

Fig. 33A ir 33B pateikta plazmidės pMP1 konstravimo schema.

Fig. 34 pateikta plazmidės pMP21 konstravimo schema.

5

Fig. 35 pateikta plazmidės pMP151 konstravimo schema.

Fig. 36 pateikta plazmidės pMP202 konstravimo schema.

10 **Fig. 37** pateikta plazmidės pMP172 konstravimo schema.

Fig. 38 pateikta plazmidės pMP210 konstravimo schema.

Fig. 39 pateikti penki geriausiai ekspresuojami TPO
15 klonai, gauti naudojant plazmidės pMP210 banką (SEQ ID
NR. 23, 24, 25, 26, 27 ir 28).

Fig. 40 pateikta plazmidės pMP41 konstravimo schema.

20 **Fig. 41** pateikta plazmidės pMP57 konstravimo schema.

Fig. 42 pateikta plazmidės pMP251 konstravimo schema.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

25 I. Apibrėžimai

Žemiau pateikti žodžiai ir frazės turi nurodytą reikšmę, kai jie panaudoti aprašyme, pavyzdžiuose ar išradimo apibrėžtyje.

"Chaotropinis agentas" - junginys, kuris vandeni-
30 niame tirpale, esant jo pakankamai koncentracijai gali sukelti baltymo konfigūracijos ar konformacijos pasikeitimus, visiškai ar ne visiškai pašalinant saveikas, atsakingas už normalios antrinės bei tretinės baltymo struktūros palaikymą. Tokių junginių pavyzdžiai yra:
35 karbamidas, guanidino hidrochloridas ir natrio

tiocianatas. Paprastai baltymo konformacijai pažeisti reikalingos didelės šių junginių koncentracijos, dažniausiai nuo 4 iki 9 M.

"Citokinas" - bendras terminas, taikomas baltymams, kurie sekretuojami vienos ląstelių populiacijos ir veikia kitą ląstelių populiaciją kaip tarpląsteliniai mediatoriai. Tokių citokinų pavyzdžiai yra: limfokinai, monokinai ir tradiciniai polipeptidiniai hormonai. Prie citokinų priskiriami: augimo hormonai (somatotropinas), į insuliną panašūs augimo faktoriai, žmogaus augimo hormonai, žmogaus N-metionilsomatotropinas, galvijų augimo hormonai, paratiroidinis hormonas, tiroksinas, insulinas, proinsulinas, relaksinas, prorelaksinas, glikoproteininiai hormonai, tokie kaip folikulus stimuliuojantis hormonas (FSH), tiroidus stimuliuojantis hormonas (TSH), liuteinizuojantis hormonas (LH), hemopoetinis augimo faktorius, hepatocitų augimo faktorius, fibroblastų augimo faktorius, prolaktinas, placentinis laktogenas, α - ir β -auglių nekrozės faktoriai, (TNF- α ir TNF- β), pelių gonadotropin-asocijuotas peptidas, inhibinas, aktivinas, vaskuliarinio endotelio augimo faktorius, integrinas, nervų augimo faktoriai, tokie kaip NGF- β , trombocitų augimo faktorius, transformuojantys augimo faktoriai (TGFs), tokie kaip TGF- α ir TGF- β , panašūs į insuliną augimo faktoriai I ir II, eritropoetinas (EPO), osteoinduktyvūs faktoriai, interferonai, tokie kaip interferonas α , β ir γ , kolonijas stimuliuojantys faktoriai (CSFs), tokie kaip makrofagų CSF (M-CSF), granulocitų-makrofagų CSF (GM-CSF) ir granulocitų CSF (G-CSF), interleukinai (ILs), tokie kaip IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 ir kiti polipeptidiniai faktoriai, tarp jų ir LIF, SCF ir kit-ligandas. Nurodyti terminai šiame kontekste apima baltymus, išgrynintus iš natūralių šaltinių ir iš rekombinantinių ląstelių

kultūrų. Analogiškai šie terminai apima ir biologiškai aktyvius jų ekvivalentus, pvz., variantus, kurie skiriasi viena ar daugiau amino rūgščių liekanomis arba glikozilinimo tipu ir laipsniu.

5 "mpl ligandas", "mpl ligando polipeptidas", "ML", "trombopoetinas" ar "TPO" yra sinonimai, kuriais vadinamas bet koks polipeptidas, kuris gali jungtis su citokinų receptorių superšeimos narių mpl receptoriumi ir kuris turi ML būdingas biologines savybes, apibrėžtas žemiau. Charakteringiausia biologinė savybė yra
10 sugebėjimas stimuliuoti žymėtų nukleotidų (pvz., ³H-timidino) įsijungimą į IL-3 priklausomų, transformuotų žmogaus mpl P genu, ląstelių Ba/F3 DNR. Kita charakteringa biologinė savybė yra sugebėjimas stimuliuoti ³⁵S
15 įsijungimą į cirkuliuojančius pelių atsakomosios trombocitozės inhibicijos metodo pagalba. Šis apibrėžimas apima polipeptidą, išskirtą iš mpl ligando šaltinio, tokio kaip aplastinių kiaulių plazma, kaip aprašyta šiame išradime, arba iš kitų šaltinių, pvz., kitų gyvūnų rūšių, tarp jų ir žmogaus, arba paruošta genoinžinieriniu ar sintetiniu būdu, o taip pat šių formų variantus, tarp jų ir funkcionalius darinius, fragmentus, alelinius variantus, izoformas ir analogus.

"Mpl ligando fragmentas" arba "TPO fragmentas" yra
25 natyvaus pilno ilgio subrendusio mpl ligando ar TPO amino rūgščių liekanų sekos dalis, kurioje trūksta vienos ar daugiau amino rūgščių liekanų ar angliavandenių. Trūkstamos amino rūgščių liekanos gali būti molekulės N gale, C gale arba viduryje. Fragmentas turi
30 bet kur: turėti bent vieną mpl ligando savybių. Mpl ligando fragmentas paprastai turi 10, 15, 20, 30 ar 40 amino rūgščių liekanų, identiškų mpl ligando, išskirto iš žinduolių, tarp jų ir iš aplastinės kiaulių plazmos, taip pat žmogaus ar pelės ligando, ypač jo EPO domenų,
35 sekai. Charakteringi N galinio fragmento pavyzdžiai yra hML₁₅₃ arba TPO(Met⁻¹ 1-153).

"Mpl ligando variantas" arba "mpl ligando sekos variantas" čia apibrėžiamas kaip biologiškai aktyvus mpl ligandas, kurio amino rūgščių liekanų seka identiška mažiau nei 100 % mpl ligando, išskirto iš rekombinantinių ląstelių kultūros arba aplastinės kiaulių plazmos, sekai, arba žmogaus ligando išvestinei amino rūgščių liekanų sekai, pateiktai Fig. 1 (SEQ ID Nr. 1). Paprastai biologiškai aktyvaus mpl ligando varianto amino rūgščių liekanų seka turi būti ne mažiau kaip 70 % identiška mpl ligando, išskirto iš aplastinės kiaulių plazmos arba subrendusio žmogaus ar pelės mpl ligando ar jų fragmentų, amino rūgščių liekanų sekai (žiūr. Fig. 1 [SEQ ID Nr. 1]); geriau, jei sekų identiškumas siekia bent 75 %, dar geriau - bent 80 %, dar geriau - bent 85 %, dar geriau - bent 90 % ir geriausias variantas - kai yra ne mažesnis kaip 95 % sekų sutapimas.

"Chimerinis mpl ligandas" yra polipeptidas, kuris sudarytas iš pilno ilgio mpl ligando ar vieno arba kelių ligando fragmentų, kurie sulieti arba sujungti su kitu heterologiniu peptidu arba jo fragmentu (vienu ar keliais). Chimerinis junginys turi turėti bent vieną mpl ligando biologinę savybę. Antras polipeptidas turi būti citokinas, imunoglobulinas arba jų fragmentai.

"Išskirtas mpl ligandas", "išgrynintas mpl ligandas" ar "homogeniškas mpl ligandas" yra sinonimai. Šiais terminais vadinamas mpl ligandas, išgrynintas iš mpl ligando šaltinio, arba pagamintas genoinžinieriniu ar sintetiniu būdais ir praktiškai neturintis kitų baltymų ar peptidų priemaišų. Švarumas nustatomas dviem metodais: (1) sekvenuojant 15, geriau 20 iš N baltymo galo ar molekulės vidurinės dalies amino rūgščių liekanų seką, naudojantis geriausiu komerciniu sekvenatoriumi ir geriausiu žinomu šiai datai būdu; (2) homogeniškumas nustatomas SDS PAGE elektroforeze redukuojan-

čiomis ir neredukuojančiomis sąlygomis, baltymo dažymui naudojamas Coomassie Blue arba, geriau, kai dažoma sidabru. Homogeniškumas reiškia, kad kitų baltymų priemaišos neviršija 5 %.

- 5 "Biologinė savybė", kai naudojama kartu su "*mpl* ligandas" ar "išskirtas *mpl* ligandas", reiškia turėti trombopoetinį aktyvumą, ar turėti *in vivo* efektorinę arba antigeninę funkcijas, arba aktyvumą, kuris tiesiogiai ar netiesiogiai sąlygojamas *mpl* ligando (nesvarbu, 10 natyvaus ar denatūruoto) ar jo fragmento. Efektorinės funkcijos apima *mpl* surišimą, ar kito nešiklio surišimą, agonizmą ar antagonizmą *mpl*, ypač proliferacijos signalo perdavimą, o taip pat replikaciją, DNR reguliatorinę funkciją, citokinų biologinio aktyvumo moduliaciją, 15 receptorių (ypač citokinų receptorių) aktyvaciją, inaktyvaciją, kiekio sumažėjimą ar padidėjimą, ląstelių augimą ir diferenciaciją ir panašiai. Antigeninė funkcija reiškia epitopo ar antigeninės determinantės, kuri gali kryžmiškai reaguoti su antikūnais prieš natyvų *mpl* 20 ligandą, buvimas. Principinė antigeninė *mpl* ligando polipeptido funkcija yra tai, kad jis jungiasi su antikūnais, pagamintais prieš *mpl* ligandą, išskirtą iš aplastinių kiaulių plazmos; šios sąveikos konstanta turi būti ne mažesnė, nei 10^6 l/M. Paprastai šios sąveikos surišimo konstanta ne mažesnė, nei 10^7 l/M. 25 Antigeniškai aktyvus *mpl* ligando polipeptidas, geriau-siai, yra tas polipeptidas, kuris sąveikauja su antikūnais, pagamintais prieš *mpl* ligandą, pasižymintį viena iš aukščiau aprašytų efektorinių funkcijų. Anti- 30 kūnai, taikomi "biologinio aktyvumo" nustatymui, yra triušio poliklonaliniai antikūnai. Šiems antikūnams pagaminti triušiai imunizuojami, suleidžiant po oda *mpl* ligandą (išskirtą iš rekombinantinių ląstelių kultūros ar aplastinės kiaulių plazmos) su pilnu Freund'o adjuvantu. Pakartotinės imunizacijos tuo pačiu preparatu į 35

pilvo ertmę vykdomos tol, kol pasiekiamas reikalingas antikūnų titras.

Terminas "biologiškai aktyvus", vartojamas kartu su terminu "*mpl* ligandas" ar "išskirtas *mpl* ligandas",
5 reiškia *mpl* ligandą ar polipeptidą, kuris pasižymi trombopoetiniu aktyvumu, ar turi tokia pat efektorinę funkciją, kaip *mpl* ligandas, išskirtas iš aplastinės kiaulių plazmos arba ekspresuotas rekombinantinių ląstelių kultūroje. Svarbiausia žinoma *mpl* ligando ar
10 polipeptido efektorinė funkcija yra *mpl* surišimas ir žymėtų nukleotidų (³H-timidino) įsijungimo į IL-3 priklausomų BA/F3 ląstelių, transfekuotų žmogaus *mpl* P DNR, stimuliacija. Kita žinoma efektorinė *mpl* ligando ar polipeptido funkcija yra sugebėjimas stimuliuoti ³⁵S
15 įsijungimą į cirkuliuojančius trombocitus, įvertinamas pelių trombocitų inhibicijos metodu. Dar viena žinoma *mpl* ligando efektorinė funkcija yra jo sugebėjimas stimuliuoti *in vitro* žmogaus megakariocitopoezę, kuria galima įvertinti, naudojant žymėtus radioaktyvia žyme
20 monokloninius antikūnus prieš megakariocitų glikoproteiną GPIIbIIIa.

Sąvoka "amino rūgščių liekanų sekos identiškumo procentas" taikoma, lyginant sekas su *mpl* ligando seka, pateikta Fig. 1 (SEQ ID Nr. 1). Ši seka atitinka *mpl*
25 ligandą, išskirtą iš aplastinės kiaulių plazmos, arba pelių ar žmogaus *mpl* ligandą. Identiškos amino rūgščių liekanos yra apibėžtos; tam, kad būtų geriau parodyta amino rūgščių sekų homologija, amino rūgščių sekose palikti tarpai, kurie pažymėti punktyru. "Identiškumo
30 procentas" yra sutampančių amino rūgščių liekanų procentas nuo visų amino rūgščių liekanų sekoje. Konservatyvių amino rūgščių liekanų pasikeitimai nelaikomi sekos identiškumo dalimi. N ir C baltymo galuose papildomos amino rūgščių liekanos, intarpai ir delecijos *mpl*
35 ligando amino rūgščių liekanų sekoje nelaikomi identišk-

kumą mažinančiais faktoriais. Tokiu būdu, biologiškai aktyvūs *mpl* ligandai, kurių sekos laikomos identiškoms, apima: prepro-*mpl* ligandą, pro-*mpl* ligandą ir subrendusį *mpl* ligandą.

- 5 "Mpl ligando mikrosekvenavimas" gali būti atliktas bet koku tinkamu standartiniu metodu, jei šis metodas yra pakankamai jautrus. Vienas būdas yra, kai išgrynintas polipeptidas išskiriamas iš SDS PAGE gelio, ar analizuojama paskutinėje HPLC stadijoje baltymo frakcija ir tiesiogiai sekvenuojama automatizuotu Edmano būdu (fenilizocianatinu), naudojant Applied Biosystems dujinį sekvenatorių kartu su 120A feniltiohidantioniniu (PTH) amino rūgščių analizatoriumi. Papildomai *mpl* ligando fragmentai buvo gaunami cheminiu (pvz., skaldant baltymą CNBr, hidroksilaminu, 2-nitro-5-tiocianbenzoatu) ar fermentiniu (pvz., skaldant tripsinu, klostripainu, stafilokokine proteinaze) būdais, po skaldymo fragmentai yra frakcionuojami (pvz. HPLC) ir panašiu būdu sekvenuojami. PTH amino rūgščių dariniai yra analizuojami naudojant ChromPerfect duomenų apdorojimo sistemą (Justice Innovation, Palo Alto, CA). Sekų analizė atliekama kompiuteriu VAX 11/785 Digital Equipment Co. kaip aprašyta Henzel et al., *J. Chromatography*, **404**:41-52 [1987]. Papildomai HPLC frakcijos gali būti elektroforezuojamos 5-20 % SDS PAGE, pernešamos į PVDF membraną (ProBlott, AIB, Foster City, CA) ir dažomos Coomassie Brilliant Blue (Matsurdiara, *J. Biol. Chem.*, **262**:10035-10038 [1987]). Specifiškai identifikuotos dažų baltymų zonos išpjaunamos ir baltymų N galo seka nustatoma dujiniu sekvenatoriumi, kaip aprašyta aukščiau. Nustatant vidines baltymų sritis, HPLC frakcijos liofilizuojamos (SpeedVac), suspenduojamos tinkamame buferiniame tirpale, skaldoma cianbromidu, Lys-specifine proteinaze Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA), ar Asp-N (Boehringer Mannheim, Indianapolis,
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

IN). Po skaldymo gauti peptidai sekvenuojami mišinyje ar po frakcionavimo HPLC C4 chromatografinėje kolonėlėje, naudojant propanolio gradientą su 0,1 % TFA.

"Trombocitopenija" apibrėžiama kaip trombocitų
5 kiekio sumažėjimas iki ar žemiau 150×10^9 trombocitų litre kraujo.

"Trombopoetinis aktyvumas" yra biologinis aktyvumas, pasireiškiantis kaip megakariocitų ar megakariocitų pirmtakų proliferacijos, diferenciacijos ir/arba
10 brendimo skatinimas. Šioms ląstelėms tampant trombocitais produktojančia forma šis aktyvumas gali būti įvertintas įvairiais metodais, tarp jų *in vivo* pelių cirkuliuojančių trombocitų inhibicijos metodu, trombocitų paviršinio antigeno indukcijos metodu, kuris yra anti-
15 trombocitų imuninis metodas (anti-GPII_bIII_a), taikomas žmogaus leukemijos megakariocitų linijai (CMK), o taip pat megakarioblastų ląstelių linijos (DAMI) poliploidizacijos proceso indukcijos metodu.

"Trombopoetinas" (TPO) apibrėžiamas kaip junginys,
20 turintis trombopoetinį aktyvumą arba sugebantis padidinti trombocitų kiekį žinduolių kraujyje. TPO gali padidinti endogeninį trombocitų kiekį 10%, geriau - 50 %, geriausiai - pakelti trombocitų skaičių žmogaus kraujyje iki 150×10^9 trombocitų litre ar daugiau.

25 "Išskirta *mpl* ligando nukleino rūgštis" yra RNR arba DNR, turinti ne mažiau 16, o geriau 20 arba daugiau nukleotidų seką, koduojančią biologiškai aktyvų *mpl* ligandą ar jo fragmentą; yra komplementari tokiai RNR ar DNR, arba hibridizuojasi su ja ir išlieka sta-
30 biliai prisijungusi esant vidutinėms arba griežtom hibridizacijos sąlygom. Šie RNR ir DNR preparatai neturi nei vieno iš šaltinio nukleino rūgščių priemaišų, su kuriomis jie paprastai yra asocijuoti gamtiniuose šaltiniuose, o taip pat šie preparatai praktiškai netu-
35 ri kitų žinduolių DNR ar RNR. Frazė "neturi nei vieno

iš šaltinio nukleino rūgščių priemaišų, su kuriais jie yra paprastai asocijuoti" apima atvejus, kai nukleino rūgštis yra šaltinyje ar ląstelėje, bet yra kitos chromosominės lokalizacijos ar flankuojama tokiomis sekomis, kurios paprastai šaltinio ląstelėse neaptinkamos. Išskirtos *mpl* ligando nukleinio rūgšties pavyzdys yra RNR arba DNR, koduojanti biologiškai aktyvų *mpl* ligandą, kurio amino rūgščių liekanų seka yra identiška žmogaus, pelių ar kiaulės *mpl* ligando sekai bent 75 %, geriau - 80 %, dar geriau - 85 %, dar geriau - 90 % ir geriausiai - 95 %.

Terminas "kontrolinės sekos", kai jis susijęs su ekspresija, reiškia DNR sekas, būtinas funkcionaliai prijungtos koduojančios sekos ekspresijai tam tikrame šeimininko organizme. Kontrolinės sekos, tinkančios prokariotams, pvz., apima promotoriaus ir operatoriaus sekas, ribosomų prisijungimo vietą ir, gal būt, kitas sekas, kurių vaidmuo nėra išaiškintas. Žinoma, kad eukariotinės ląstelės naudoja promotorius, poliadenilavimo signalus ir stiprintojus.

Terminas "funkcionaliai prijungta", kai jis naudojamas nukleino rūgštims, reiškia, kad nukleino rūgštis sujungta su kita nukleino rūgšties seka, su kuria ją sieja funkcionalūs ryšiai. Pavyzdžiui, sekretorinio lyderio DNR funkcionaliai sujungta su polipeptido DNR; tokiu atveju šis polipeptidas ekspresuojamas kaip pre-baltymas, kuris dalyvauja polipeptido sekrecijoje; promotorius ir sustiprintojas funkcionaliai prijungti prie koduojančios sekos ir reguliuoja šios sekos transkripciją; ribosomų prisijungimo vieta, funkcionaliai prijungta prie koduojančios sekos, palengvina translaciją. Paprastai "funkcionalus prijungimas" įgyvendinamas tiesiogiai sujungiant kontrolinę ir koduojančią sekas, o lyderinės sekos atveju šis prijungimas neturi pažeisti atviro skaitymo rėmelio. Tai nebūtina sustiprintojams. Prijungimas įvykdomas ligavimu tam tikrose

restriktazių skėlimo vietose. Jei tokių vietų nėra, naudojami sintetiniai oligonukleotidiniai adapteriai arba jungikliai (linkeriai), kaip įprasta klonavimo praktikoje.

- 5 "Egzogeninis" elementas yra nukleino rūgšties seka, svetima ląstelei arba homologiška ląstelei, bet esanti tokioje pozicijoje, kokioje šis elementas ląstelės-šeimininkės nukleino rūgštyje paprastai neaptinkamas.
- 10 Terminai "ląstelė", "ląstelių linija" ir "ląstelių kultūra" naudojami kaip sinonimai ir apima visas ląsteles arba ląstelių linijos palikuonys. Pvz., toks terminas kaip "transformantai" arba "transformuotos ląstelės" apima pirminę transformuotą ląstelę ir iš jos iš-
- 15 augintą kultūrą, nepriklausomai nuo persėjimų skaičiaus. Suprantama, kad ne visų palikuonių DNR griežtai identiška, nes ląstelėse vyksta tikslinės arba atsitiktinės mutacijos. Tie palikuonys, kuriuose mutacijos nepažeidė norimos funkcijos bei biologinio aktyvumo, ir
- 20 toliau priskiriami prie transformantų. Iš konteksto paaiškės atvejai, kai tokie mutantai specialiai vadinami kitaip, nei pradinis transformantas.

"Plazmidės" - autonomiškai besireplikuojančios žiedinės DNR molekulės, turinčios nepriklausomą replikacijos iniciacijos vietą; tekste žymimos arba mažąja "p" raide prieš pavadinimą, arba didžiosiomis raidėmis ir/arba numeriais po pavadinimo. Pradinės plazmidės, naudojamos šiame išradime, yra arba perkamos, arba

25 laisvai prieinamos, arba gali būti sukonstruotos minėtų plazmidžių pagrindu, naudojant publikuotus metodus. Kitos ekvivalentiškos plazmidės gerai žinomos ir prieinamos eiliniam šios srities specialistui.

30

"Skaldymas restrikcijos fermentais" - kai kalbama apie DNR, reiškia katalitinį vidinių DNR fosfodiesterinių jungčių skaldymą, naudojant fermentą, kuris veikia tik tam tikrose DNR sekos vietose. Tokie fermentai

35

vadinami "restrikcijos endonukleazėmis". Kiekviena restrikcijos endonukleazė atpažįsta specifinę DNR seką, vadinama "restrikcijos vieta", kuri pasižymi antrine simetrija. Skirtingi restrikcijos fermentai, naudojami
5 šiame išradime, yra komerciniai reagentai; reakcijos sąlygos bei kofaktoriai visiškai atitinka fermentų gamintojų rekomendacijas. Viešai priimta, kad restrikcijos fermentų pavadinimus sudaro sutrumpintas mikroorganizmo, iš kurio šis fermentas buvo pirmą kartą išskirtas,
10 pavadinimas ir skaičius, žymintis patį fermentą. Paprastai lūg plazmidės arba DNR fragmento suskaldymui naudojami 1-2 vienetai fermento ir apie 20 µl buferinio tirpalo. Optimalius buferių ir substrato kiekius kiekvienam restrikcijos fermentui nurodo gamintojas. Dažniausiai reakcija vyksta apie 1 valandą 37°C temperatūroje, tačiau šitos sąlygos gali skirtis, jeigu tai nurodyta gamintojo specifikacijoje. Po inkubacijos baltymas arba polipeptidas pašalinamas ekstrahuojant fenoliu ir chloroformu, o suskaldyta DNR išskiriama iš
20 vandens fazės išsodinant etilo alkoholiu. Po skaldymo gali būti atliekama 5' galo fosfatinių grupių hidrolizė, naudojant bakterinę šarminę fosfatazė; tai daroma, kad būtų išvengta DNR fragmentų galų susijungimo, t.y. žiedinės struktūros formavimosi, nes į tokios struktūros restrikcijos vietą nebus galima įterpti kito
25 DNR fragmento. Jeigu tai nėra specialiai pažymėta, 5' galų defosforilinimas po plazmidės suskaldymo nebuvo taikomas. Defosforilinimo procedūra ir jai reikalingi reagentai aprašyti Sambrook, et al. knygos "Molecular
30 cloning" [New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989] 1.56-1.61 skyriuose.

Tam tikro DNR fragmento "išskyrimas" ar "izoliacija" iš restrikcijos produktų apima: fragmentų mišinio frakcionavimą elektroforezės būdu poliakrilamidiniame
35 ar agaroziniame gelyje; reikiamo fragmento identifikavimą pagal jo judrumą elektroforezėje (palyginama su

žinomo molekulinio svorio markerinių DNR fragmentų judrumu); gelio gabaliuko, kuriame yra norimas fragmentas, išpjovimą; gelio ir DNR atskirimą. Ši procedūra yra gerai žinoma (žiūr. Lawn et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:6103-6114 [1981], ir Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 [1980]).

"Southern analizė" arba "Southern blotingas" - metodas, kurio pagalba nustatomas vienos ar kitos DNR sekos buvimas tiek mišinyje, kuriame yra DNR, tiek ir restrikcijos endonukleazėmis suskaldytoje DNR, hibridizuojant su žinomu žymėtu oligonukleotidu arba DNR fragmentu. Southern analizė paprastai apima elektroforetinį DNR frakcionavimą agaroziniame gelyje, frakcionuotos DNR denatūraciją ir pernešimą ant nitroceliuliozinės, nailoninės ar kitos tinkamos membranos ir tolesnę analizę su DNR pavyzdžiu, žymėtu radioaktyvia žyme, biotinu ar fermentu (žiūr. Sambrook et al., *supra*, skirsniai 9.37-9.52).

"Northern analizė" arba "Northern blotingas" - metodas, kurio pagalba identifikuojamos RNR sekos, besihibridizuojančios su žinomu pavyzdžiu, tokiu kaip oligonukleotidas, DNR fragmentas, kDNR ar jos fragmentas, arba RNR fragmentas. Tokie pavyzdžiai žymimi radioaktyviu izotopu (^{32}P), arba biotinu, arba fermentu. Analizuojama RNR paprastai elektroforetiškai frakcionuojama agaroziniame arba poliakrilamidiniame gelyje, pernešama ant nitroceliuliozinės, nailoninės ar kitos tinkamos membranos ir hibridizuojama su pavyzdžiu, naudojant standartines procedūras, gerai žinomas šios srities specialistams (žiūr. Sambrook et al., *supra*, skirsniai 7.39-7.52).

"Ligavimas" - procesas, kuris formuoja fosfodiesterinius ryšius tarp dviejų nukleino rūgšties fragmentų. Tam, kad ligavimas galėtų įvykti, fragmentų galai turi vienas kitą atitikti. Kai kuriais atvejais tinkami galai susidaro iš karto po skaldymo endonuklea-

zėmis. Tačiau dažnai po restrikcijos pirmiausia reikia
bukus galus paversti lipniais - tinkamais ligavimui.
Tam tikslui, DNR mažiausiai 15 min. inkubuojama 15°C
temperatūroje tinkamame buferyje, turinčiame apie 10
5 vienetų DNR polimerazės I Klenow fragmento arba fago T4
DNR polimerazės ir visus keturis dezoksiribonukleotid-
trifosfatus. Po šitos procedūros DNR išgryninama, eks-
trahuojant fenolio-chloroformo mišiniu ir išsodinant
etilo alkoholiu. DNR fragmentai, kurie turi būti "su-
10 siūti", sumaišomi tam tikrame tirpale ekvimoliariniu
santykiu. Į šio tirpalo sudėtį įeina ATP, ligazės bufe-
rinis tipalas ir ligazė, pvz.: T4 DNR ligazė, apie
10 vienetų/0,5 µg DNR. Jeigu DNR turi būti įsiūta į
vektorių, tai pastarasis pirmiausia suskaldomas tinkama
15 restrikcijos endonukleaze, tam kad vektorius būtų per-
vestas iš žiedinės į linijinę formą. Linearizuotas
fragmentas toliau veikiamas bakterine ar kitos kilmės
šarminė fosfataze, tam, kad ligavimo metu vektoriaus
galai vėl nesusijungtų, sudarydami žiedinę molekulę.

20 DNR "išskyrimas" iš ląstelių reiškia plazmidės DNR
išskyrimą iš ląstelių-šeimininkų kultūros. Dažniausiai
taikomi didelių ir mažų DNR kiekių išskyrimo metodai
aprašyti (žiūr. Sambrook et al., *supra*, skirsniai 1.25-
1.33). Po DNR išskyrimo ji gali būti toliau išgryninta,
25 naudojant gerai žinomus metodus (žiūr. Sambrook et al.,
supra, skirsnis 1.40).

"Oligonukleotidai" - trumpi, viengrandžiai ar dvi-
grandžiai polidezoksinukleotidai, susintetinti cheminės
sintezės būdu per dezoksinukleozid-H-fosfonatinius tar-
30 pinius junginius (Froehler et al., *Nucl. Acids Res.*,
14: 5399-5407 [1986]), arba naudojant tokius žinomus
metodus kaip fosfotriesterinis, fosfitinis ar fosfor-
amiditinis metodas kietoje fazėje (aprašyti EP 266032
publikuotame 1988.05.04). Kiti metodai apima polimera-
35 zinę grandininę reakciją, apibrėžtą žemiau, ir kitus
autopradmeninius metodus, o taip pat oligonukleotidų

sintezę ant kieta nešiklio. Visi šie metodai aprašyti (Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**:716-734 [1989]). Šie metodai taikomi tais atvejais, kai žinoma visa geno nukleino rūgšties seka arba seka, komplementari koduojančiai grandinei. Kita vertus, jeigu žinoma taikinio amino rūgščių liekanų seka, nukleino rūgšties seka gali būti išvesta žinant dažniausiai pasitaikančius amino rūgštis koduojančius trinukeotidus. Po sintezės oligonukleotidai išgryninami elektroforetiškai

10 poliakrilamidiniame gelyje.

"Polimerazinė grandininė reakcija" arba "PCR" - metodas, kurio pagalba padauginami labai maži specifinių nukleino rūgšties, RNR ir/arba DNR fragmentų kiekiai (žiūr. JAV patentas Nr.4,683,195, išleistas

15 1987.07.28). Taikant šį metodą, reikia žinoti norimo padauginti fragmento galines sekas tam, kad būtų galima susintetinti pradmenis; šie pradmenys turi būti identiški arba labai panašūs į sekas komplementarias dauginamai matricai. 5'galiniai pradmenų nukleotidai gali

20 sutapti su dauginamo fragmento galais. PCR galima panaudoti dauginant specifines RNR sekas, specifines DNR sekas iš totalinės genominės DNR, kDNR, transkribuotos nuo totalinės ląstelės RNR, taip pat bakteriofago bei plazmidžių sekas ir t.t.(žiūr. Mullis et al., *Cold*

25 *Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, **51**:263 [1987]; Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989)). PCR yra vienas, bet ne vienintelis nukleino rūgščių polimerazinės reakcijos metodas, pritaikytas nukleino rūgšties pavyzdžio dauginimui, naudojant žinomas nukleino

30 rūgštis kaip pradmenis ir polimerazinę reakciją kaip būdą padauginti arba sukurti specifinį nukleininės rūgšties fragmentą.

"Griežtos sąlygos" - tokios sąlygos, kurioms esant (1) plovimams taikomi mažos joninės jėgos ir aukštos

35 temperatūros tirpalai, pvz.: 0,015M NaCl/0,0015M natrio citratas/0,1% NaDodSO₄ (SDS) ir 50°C temperatūra; (2)

hibridizacijos metu naudojami denatūruojantis agentai, tokie kaip formamidas, pvz.: 50 % (tūris/tūryje) formamidas su 0,1% galvijų serumo albuminu/0,1% fikolis/0,1% polivinilpirolidonas/50 mM natrio fosfatinis buferis tirpalas (pH 6,5) su 750 mM NaCl, 75 mM natrio citrato ir 42°C temperatūra. Kitame pavyzdyje hibridizacija vykdoma tokiam tirpale: 50 % formamido, 5xSSC (0,75mM NaCl, 0,075M natrio citratas), 50 mM natrio fosfatas (pH 6,8), 0,1% natrio pirofosfatas, 5xDenhardto tirpalas, ultragarsu apdorota lašišos spermos DNR (50 µg/ml), 0,1 % SDS ir 10 % dekstransulfatas; hibridizacija vyksta 42°C temperatūroje, praplovimus atliekant 42°C temperatūroje 0,2xSSC su 0,1% SDS.

"Vidutiniškai griežtos" sąlygos aprašytos Sambrook et al., supra, kuriose praplovimo bei hibridizacijos sąlygos (temperatūra, joninė jėga ir SDS koncentracija) ne tokios griežtos, kaip aprašyta aukščiau. Vidutiniškai griežtų sąlygų pavyzdys pateikiamas žemiau: inkubacija pernakt 37°C temperatūroje; į hibridizacijos tirpalo sudėtį įeina 20 % formamidas, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM trinatrio citratas), 50 mM natrio fosfatas (pH 7,6), 5x Denhardto tirpalas, 10 % dekstransulfatas ir 20 µl/ml denatūruotos fragmentuotos lašišos spermos DNR; membrana atplaunama 1xSSC tirpalu esant 37-50°C temperatūrai. Patyręs specialistas mokės parinkti tinkamas sąlygas kiekvienam konkrečiam atvejui.

"Antikūnai" (Abs) ir "imunoglobulinai" (Igs) - glikoproteinai, turintys vienodas struktūrines charakteristikas. Antikūnams būdinga specifinė sąveika su tam tikru antigenu, o imunoglobulinai apima ir antikūnus, ir panašios struktūros molekules, nepasižyminčias tokia specifine sąveika. Pastarojo tipo polipeptidus produkuoja mažais kiekiais limfoidinė sistema, o dideliais - mielomos.

"Natyvūs antikūnai ir imunoglobulinai" - apie 150 kD molekulinės masės heterotetrameriniai glikoproteinai, susidedantys iš dviejų identiškų lengvųjų (L) ir dviejų identiškų sunkiųjų (H) grandinių. Lengvoji ir sunkioji grandinės tarpusavy sujungtos viena kovalentine disulfidine jungtimi, tuo tarpu disulfidinių jungčių kiekis tarp sunkiųjų grandinių skiriasi, priklausomai nuo imunoglobulino izotipo. Kiekvienoje sunkiojoje bei lengvojoje grandinėje yra taip pat reguliariai išdėstyti vidugrandininiai disulfidiniai tiltai. Viename sunkiosios grandinės gale yra variabilus domenas (V_H), po kurio seka keli pastovieji domenai. Kiekviena lengvoji grandinė viename gale turi variabilų domeną (V_L), o kitame - pastovųjį (C_L) domeną; pastovusis lengvosios grandinės domenas yra ties pirmuoju pastovaus sunkiosios grandinės domenu, o variabilus lengvosios grandinės domenas yra asocijuotas su variabiliu sunkiosios grandinės domenu. Žinoma, kad tam tikrose pozicijose esančios amino rūgščių liekanos formuoja lengvosios ir sunkiosios grandinių variabilų domenų tarpą (Clothia et al., *J. Mol. Biol.*, **186**:651-663 [1985]; Novotny and Haber, *Proc. Natl. Sci. USA*, **82**:4592-4596 [1985]).

Terminas "variabilus" atspindi tą faktą, kad tam tikrų variabilų domenų dalinių amino rūgščių liekanų sekos yra labai skirtingos ir, būtent, šios dalys dalyvauja formuojant sąveikos su antigenų centru ir apsprendžia specifinę antigeno ir antikūno sąveiką. Tačiau sekos variabilumas netolygiai paskirstytas variabiliame domene. Tiek lengvosios, tiek sunkiosios grandinių variabilų domenų skirtumai sukoncentruoti trijuose segmentuose, vadinamuose komplementarumą apsprendžiančiais regionais (CDR_s) arba hipervariabiliais regionais. Labiausiai konservatyvios variabilų domenų dalys vadinamos karkasais (Framework, FR). Natūvių lengvųjų ir sunkiųjų grandinių variabilūs domenai turi keturis

FR, turinčius β -klosčių struktūrą, ir sujungtus į kilpatrimis CDRs, kai kuriais atvejais sudarančiais β -klosčių struktūrų dalį. Kiekvienoje grandinėje CDRs išsilaiko šalia vienas kito erdvinėje struktūroje FR regionų dėka ir kartu su kitos grandinės CDRs regionais sudaro antikūno sąveikos su antigenu centrą (žiūr. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, MD [1987]). Pastovieji domenai tiesiogiai nedalyvauja sąveikoje su antigenu, tačiau jie atlieka įvairias efektorines funkcijas, pvz.: apsprendžia antikūnų dalyvavimą nuo antikūnų priklausiančioje ląstelių toksiškumo reakcijoje.

Antikūną suskaldžius papainu, susidaro du identiški antigeną rišantys fragmentai, vadinami "Fab" fragmentais, kurie turi po vieną sąveikos su antigenu centrą, ir "Fc" fragmentas, kurio pavadinimas kilo iš jo savybės lengvai kristalizuotis. Suskaldžius antikūną pepsinu susidaro $F(ab')_2$ fragmentas, kuris turi 2 sąveikos su antigenu centrus ir todėl gali sujungti dvi antigeno molekules.

"Fv" yra pats mažiausias antikūno fragmentas, turintis pilną antigeno atpažinimo ir surišimo vietą. Šis fragmentas yra sunkiosios ir lengvosios grandinių variabilių domenų dimeras, išlaikomas stipria nekovalentine sąveika. Būtent šioje konfigūracijoje, kurioje sąveikauja po tris kiekvieno variabilaus domeno CDRs regionus, susidaro antigeną rišanti vieta V_H - V_L dimero paviršiuje. 6 CDRs kolektyviai apsprendžia antikūno specifiškumą. Tačiau net ir vienas variabilus domenas (arba pusė Fv, kuris sudarytas tik iš trijų CDRs) gali atpažinti ir surišti antigeną, nors ir su mažesniu afiniškumu, nei pilnas surišimo centras.

Į Fab fragmento sudėtį įeina lengvosios grandinės pastovusis domenas ir pirmasis pastovusis (CH1) sunkiosios grandinės domenas. Fab' fragmentas skiriasi nuo

Fab fragmento tuo, kad prie sunkiosios grandinės CH1 domeno karboksilinio galo yra keletas papildomų amino rūgščių liekanų, tarp jų viena ar daugiau cisteino liekanų iš antikūno talijos regiono. Fab', turintys cisteino liekanų su laisva tioline grupe, vadinami Fab'-SH. Antikūnų F(ab')₂ fragmentai gaminami kaip Fab' fragmentų poros, sujungtos talijos regiono cisteinais. Taip pat žinomi ir kiti cheminiai antikūnų fragmentų sujungimo būdai.

10 Pagal pastovaus domeno amino rūgščių liekanų seką visų stuburinių gyvūnų antikūnų (imunoglobulinų) "lengvosios grandinės" skirstomos į du aiškiai skirtingus tipus, vadinamus kapa (κ) ir lambda (λ).

Priklausomai nuo sunkiosios grandinės pastoviųjų domenų amino rūgščių liekanų sekos, imunoglobulinai skirstomi į kelias klases. Yra 5 pagrindinės imunoglobulinų klasės: IgA, IgD, IgE, IgG ir IgM, ir kai kurios iš jų toliau skirstomos į poklasių (izotipus), pvz.: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; IgA1 ir IgA2. Sunkiųjų grandinių pastoviuosius domenus, atitinkančius šias pagrindines klases, žymime α , δ , ϵ , γ ir μ , atitinkamai. Įvairių klasių imunoglobulinų subvienetų struktūra ir erdvinė konfigūracija gerai žinomos.

Terminas "antikūnas" labai plačiai naudojamas ir taikomas tiek monokloniniams antikūnams (tarp jų agonistiniams ir antagonistiniams), tiek ir antikūnų mišiniams su poliepitopiniu specifiškumu bei antikūnų fragmentams (pvz.: Fab, F(ab')₂ ir Fv), jei pastarieji išlaiko norimą biologinį aktyvumą.

30 Terminas "monokloniniai antikūnai" čia naudojamas aprašant antikūnus, gautus iš praktiškai homogeniškos antikūnų populiacijos, kurioje individualios antikūnų molekulės yra visiškai identiškos, išskyrus nedidelius kiekius natūraliu būdu atsirandančias mutantines molekules. Monokloniniai antikūnai yra labai specifiški ir reaguoja tik su viena antigenine determinante. Skirtin-

gai nuo tradicinių (polikloninių) antikūnų preparatų, kuriuos sudaro skirtingi antikūnai prieš skirtingas antigenines determinantes (epitopus), kiekvienas monokloninis antikūnas reaguoja tik su viena antigeno determinante. Be didelio specifiškumo kitas monokloninių antikūnų privalumas yra tas, kad jie gaminami hibridominių ląstelių kultūroje ir todėl neužteršti kitais imunoglobulinais. Būdvardis "monokloninis" nurodo, kad antikūnas išskirtas iš praktiškai homogeninės antikūnų populiacijos ir neapsiriboja vienu konkrečiu antikūnų gavimo būdu. Pvz.: monokloniniai antikūnai, naudojami šiame išradime, gali būti pagaminti tiek hibridominiu metodu pagal Kohler & Milstein, *Nature*, **256**: 495 (1975), tiek genoinžineriniu metodu (žiūr. pvz., JAV patentą Nr. 4816567 [Cabilly et al.]).

Šiame išradime minimi monokloniniai antikūnai apima "chimerinius" antikūnus (imunoglobulinius), kuriuose dalis sunkiosios ir /arba lengvosios grandinės identiška ar homologiška atitinkamoms sekoms tų antikūnų, kurie išskirti iš vienos gyvūnų rūšies arba priklausantys vienai antikūnų klasei ar poklasiui, tuo tarpu kita grandinės (grandinių) dalis identiška ar homologiška sekoms tų antikūnų, kurie išskirti iš kitos gyvūnų rūšies arba priklausantys kitai antikūnų klasei ar poklasiui; čia taip pat įeina ir tokių chimerinių molekulių fragmentai, jeigu jie turi norimą biologinį aktyvumą (JAV patentas Nr. 4816567 (Cabilly et al.); Morrison et al., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 [1984]).

"Humanizuoti" ne žmogaus kilmės antikūnai (pvz.: pelių) tai yra chimeriniai imunoglobulinai, arba jų grandinės, arba jų fragmentai (tokie kaip Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ arba kitokios antigeną rišančios sekos, gautos iš antikūnų), kuriuose ne žmogaus kilmės sekų

kiekis yra sumažintas iki minimumo. Daugeliu atveju humanizuoti antikūnai yra žmogaus imunoglobulinai (recipientinis antikūnas), kuriuose komplementarumą apsprendžiančių regionų (CDR) liekanos yra pakeistos

5 CDR liekanomis iš ne žmogaus kilmės, pvz.: pelės, triušio ar žiurkės, turinčių norimą specifiškumą ir afiniškumą, donorinių antikūnų. Kai kuriais atvejais žmogaus imunoglobulino Fv karkasinės amino rūgščių liekanos gali būti pakeistos atitinkamomis ne žmogaus kilmės

10 sekų liekanomis. Dar daugiau, humanizuotuose antikūnuose gali būti amino rūgščių liekanų, kurių nėra nei recipientinėse, nei donorinėse CDR ar karkasinėse sekose. Tai daroma tam, kad būtų pagerintas ir optimizuotas antikūnų aktyvumas. Humanizuoti antikūnai susidaro

15 mažiausiai iš vieno ar, dažniausiai, iš dviejų variabilių domenų, kuriuose visos arba beveik visos CDR liekanos yra ne žmogaus kilmės, o visos ar beveik visos FR liekanos yra žmogaus. Humanizuotuose antikūnuose taip pat yra bent dalis pastovaus regiono (Fc), paprastai

20 tai žmogaus imunoglobulino regiono dalis. Smulkesnius aprašymus galima rasti (Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 [1986]; Reichmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-329 [1988]; Presta, *Curr. Op. Biol.*, **2**:593-596 [1992]).

"Neimunogeniškas žmogui" reiškia, kad vaistinė

25 polipeptido forma, esant jos atitinkamai terapinei dozei, kontaktuodama su atitinkamais žmogaus audiniais, nesukelia jokios jautrumo ar atsparumo polipeptidui būklės, kuri pasireikštų vartojant polipeptidą antrą kartą, praėjus atitinkamam latentiniam periodui (pvz.:

30 po 8-14 dienų).

II. Geriausi išradimo variantai

Šiame išradime aprašyti polipeptidai yra praktiškai homogeniškas polipeptidas (polipeptidai), vadinamas

35 *mpl* ligandu (ligandais) arba trombopoetinu (TPO), kuris

gali jungtis su *mpl*, citokinų receptorių superšeimos nariu, ir turi biologinę savybę stimuliuoti žymėtų nukleotidų (³H-timidino) įsijungimą į IL-3 priklausomų Ba/F3 ląstelių, transformuotų žmogaus *mpl* P genu, DNR.

5 Šiame išradime aprašytas *mpl* ligandas(ligandai) - tai išskirtas žinduolių baltymas(baltymai), turintis hemopoetinį, ypač megakariocitopoetinį ar trombopoetinį, aktyvumą - būtent, sugebantis stimuliuoti nesubrendusių megakariocitų ar jų pirmtakų proliferaciją, brendimą

10 ir/arba diferenciaciją į subrendusius trombocitus produkujančią formą. Konkrečiai šiame išradime aprašyti polipeptidaitai žmogaus *mpl* ligandas(ligandai), arba jo fragmentai, turintys hemopoetinį, megakariocitopoetinį ar trombopoetinį aktyvumą. Šie žmogaus *mpl*

15 ligandai nebūtinai glikozilinti. Kiti pateikiami žmogaus *mpl* ligandai yra hML "EPO-domenas", vadinamas hML₁₅₃ arba hTPO₁₅₃, sutrumpinta hML forma, vadinama hML₂₄₅ arba hTPO₂₄₅, ir pilno ilgio subrendęs polipeptidas, turintis Fig. 1 (SEQ ID Nr.: 1) parodytą amino

20 rūgščių liekanų seką, vadinamas hML, hML₃₃₂ arba TPO₃₃₂, o taip pat biologiškai aktyvus šio polipeptido variantas su pakeistomis amino rūgščių liekanomis - hML(R153A, R154A).

Taip pat šiame išradime aprašyti polipeptidai -

25 biologiškai arba imunologiškai aktyvūs *mpl* ligando variantai, atrinkti iš hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML ir pML2.

Taip pat pateikiami šiame išradime polipeptidai - biologiškai aktyvūs *mpl* ligando variantai, kurių amino

30 rūgščių liekanų sekos mažiausiai 70% identiškos žmogaus *mpl* ligando sekai (žiūr. Fig. 1 [SEQ ID Nr.:1]), pelės *mpl* ligando sekai (žiūr. Fig. 16 [SEQ ID Nr.:12 ir 13]), kiaulės rekombinantinio *mpl* ligando sekai (žiūr. Fig. 19 [SEQ ID Nr.:18]) arba kiaulės *mpl*

35 ligando, išskirto iš aplastinės kiaulės plazmos, sekai.

Pateikiamas identiškumas siekia mažiausiai 75%, o geriausia, jeigu jis siekia 95 % ir daugiau.

mpl ligandas, išskirtas iš aplastinių kiaulių plazmos, charakterizuojamas taip:

- 5 (1) Dalinai išgrynintas ligandas eliuuojamas iš gelfiltracinės kolonėlės, atliekant chromatografiją PBS, PBS su 0,1 % SDS ar PBS su 4 M $MgCl_2$, 60-70 kD molekulinį masių srityje.
- (2) Ligandas aktyvumą praranda paveikus pronaze
- 10 (3) Ligandas yra stabilus esant žemam pH (2,5), esant 0,1 % SDS ir 2 M karbamido;
- (4) Ligandas yra glikoproteinas, nes jis yra sorbuojamas įvairiais lecitino sorbentais;
- (5) Išgryninto ligando eliuatai iš SDS PAGE gelio,
- 15 analizę atlikus neredukuojančiomis sąlygomis, yra 25-25 kD molekulinį masių zonoje. Mažesni jo kiekiai aptinkami ~18-22 ir 60 kD zonose;
- (6) Išgrynintas ligandas SDS PAGE analizėje redukuojančiomis sąlygomis išsiskiria į dvi juostas - 28 ir
- 20 31 kD;
- (7) Ligando formų, išskirtų iš 18-22, 28 ir 31 KD zonų, N galo amino rūgščių liekanų sekos yra tos pačios - SPAPPACDPRLLNKLLRDDHVLHGR (SEQ ID Nr.:29); ir
- (8) Ligandas yra sorbuojamas ir desorbuojamas nuo šių
- 25 sorbentų:
 - Blue-Sepharose,
 - CM Blue-Sepharose
 - MONO-Q,
 - MONO-S,
 - 30 Lentil lectin-Sepharose,
 - WGA-Sepharose,
 - Con A-Sepharose,
 - Ether 650m Toyopearl,
 - Butyl 650m Toyopearl,
 - 35 Phenyl 650m Toyopearl ir

Phenyl-Sepharose.

Labiau tinkami *mpl* ligando polipeptidai yra tie, kurie koduojami žmogaus genomine ar kDNR, kurių amino rūgščių liekanų seka yra pateikta Fig. 1 (SEQ ID
5 Nr.:1).

Kiti gamtiniai biologiškai aktyvūs *mpl* ligando polipeptidai - šio išradimo objektai - yra prepro-*mpl* ligandas, pro-*mpl* ligandas, subrendęs *mpl* ligandas, *mpl* ligando fragmentai ir glikozilinti variantai.

10 Kiti šiame išradime aprašyti polipeptidai apima *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekos variantus ir chimeras. Kaip įprasta, priimtinais laikomi tie biologiškai aktyvūs *mpl* ligando variantai ir chimeros, kurių amino rūgščių liekanų sekų homologiškumas žmogaus *mpl*
15 ligandui ar *mpl* ligandui, išskirtam iš aplastinių kiaulių, yra ne mažesnis nei 70 %, geriau, kai homologija yra bent 75 %, dar geriau, kai - bent 80 %, dar geriau, kai - bent 85 %, dar geriau, kai - bent 90 % ir geriausia, kai nemažiau 95 %. Vienas pavyzdinių *mpl* ligando
20 variantų yra hML N galo domenas (vadinamas "EPO-domenų" dėl amino rūgščių liekanų sekos homologijos su eritropoetinu). Geriausią hML EPO domeną sudaro apie 153 pirmųjų amino rūgščių liekanų iš subrendusio hML ir todėl jis vadinamas hML₁₅₃. Dar geresnis hML amino rūgščių
25 ūčių liekanų sekos variantas yra tas, kuriame viena ar kelios bazinės arba dviejų bazinių amino rūgščių liekanų poros, esančios C galo domene, pakeistos į nebazines amino rūgščių liekanas (pvz., į hidrofobines, neutra-
lias, rūgščias, aromatines, Gly, Pro ar panašias).
30 Geriausia hML C galo domeno seka yra tokia, kur 153 ir 154 Arg liekanos pakeistos Ala liekanomis. Šis variantas vadinamas hML₃₃₂ (R153A, R154A). Kiti geriausi hML variantai yra arba hML₃₃₂, arba hML₁₅₃, kuriuose amino rūgščių liekanos nuo 111 iki 114 (QLPP arba LPPQ) yra
35 pašalintos arba pakeistos kitais tetrapeptidais (pvz.,

AGAG ar panašiais). Šie deleciniai mutantai vadinami $\Delta 4\text{hML}_{332}$ ir $\Delta 4\text{hML}_{153}$.

Geriausia chimera yra baltymas, kur *mpl* ligandas arba jo fragmentas (apibrėžtas žemiau) sulietas su
5 heterologiniu polipeptidu arba jo fragmentu. Pavyzdžiui, hML_{153} gali būti suliejamas su IgG fragmentu, siekiant prailginti preparato cirkuliacijos kraujyje laiką, arba su IL-3, G-CSF ar EPO, siekiant gauti molekulę su didesniu trombopoetiniu aktyvumu ar su
10 chimerinių komponentų aktyvumu.

Kita geriausia žmogaus *mpl* ligando chimera yra "ML-EPO domeno chimera", kuri sudaryta iš 153-157 N gale esančių hML amino rūgščių liekanų, kur viena ar kelios, bet ne visos, liekanos pakeistos žmogaus EPO
15 liekanomis, kaip parodyta Fig. 10 (SEQ ID Nr.:7). Šiame išradime hML chimera turi būti apie 153-166 amino rūgščių liekanų ilgio ir atskiros amino rūgščių liekanos ar individualūs liekanų blokai yra paimti iš žmogaus EPO sekos ir įterpti į hML baltymo seką, arba pakeista
20 dalis hML sekos, vietose, kurios nurodytos Fig. 10 (SEQ ID Nr.:6). Tokių intarpinių sekų pavyzdžiai apima: vieną ar kelias N-glikozilavimo vietas, esančias EPO amino rūgščių liekanų sekoje pozicijose 24-27, 38-40 ir 83-85; vieną ar kelias iš keturių spėjamų amfipatinių
25 α -spiralių sričių, esančių EPO amino rūgščių liekanų sekoje pozicijose 9-22, 59-76, 90-107 ir 132-152; taip pat kitas konservatyvias sritis, tarp jų EPO molekulės N ir C galų amino rūgščių liekanų sekas, bei liekanas, esančias pozicijoje (epo) 44-52 (žiūr., pvz., Wen et
30 al., *Blood*, 82:1507-1516 [1993] ir Boissel et al., *J. Biol. Chem.*, 268(21): 15983-15993 [1993]). Tikimasi, kad ši "ML-EPO domeno chimera" turės mišrų trombopoetini-eritropoetini (TEPO) biologinį aktyvumą.

Kiti šio išradimo polipeptidai apima *mpl* ligando
35 fragmentus, turinčius nepertraukiamas bent 10, 15, 20,

25, 30 ar 40 amino rūgščių liekanų sekas, identišką *mpl* ligando, išskirto iš aplastinių kiaulių plazmos arba čia aprašyto žmogaus *mpl* ligando (žiūr. Lentelę 14, Pavyzdį 24) amino rūgščių liekanų sekoms.

5 Geriausias *mpl* ligando fragmentas yra žmogaus ML[1-X], kur X yra 153, 164, 191, 205, 207, 217, 229 ar 245 (žiūr. Fig. 1 [SEQ ID Nr.:1]). Kiti geriausi *mpl* ligando fragmentai yra tie fragmentai, kurie gauti cheminės ar fermentinės hidrolizės būdu iš išgryninto

10 ligando.

Kitas išradimo aspektas yra *mpl* ligando molekulių išgryninimo būdas, kuris apima: *mpl* ligando šaltinio, turinčio *mpl* ligando molekulių, sąveiką su imobilizuotu receptoriaus polipeptidu, konkrečiai su *mpl* ar *mpl*

15 hibridiniu polipeptidu, tokiomis sąlygomis, kai gryninamos *mpl* ligando molekulės selektyviai sorbuojasi ant imobilizuoto receptoriaus polipeptido, sorbento praplovimą, pašalinant nesisorbavusius pašalinius baltymus, ir gryninamų molekulių eliaciją nuo imobilizuoto receptoriaus polipeptido eliacijos buferiniu tirpalu. *mpl*

20 ligando šaltinis gali būti plazma, o geriausias imobilizuotas receptorius yra *mpl*-IgG sulietas polipeptidas.

Taip pat *mpl* ligando šaltinis gali būti rekombinantinė kultūra, kur *mpl* ligando koncentracija kultūriname skystyje arba ląstelių lizatuose yra žymiai didesnė, nei plazmoje ar kituose gamtiniuose šaltiniuose. Todėl aukščiau aprašytas *mpl*-IgG imunoafininis būdas nebūtinai gali būti taikomas, nes gali būti pritaikomi kiti žinomi tradiciniai baltymų gryninimo metodai.

25 Trumpai, geriausias gryninimo būdas, kurio metu gaunamas homogeniškas *mpl* ligandas, apima šeiminko ląstelių nuolaužų ar lizavimo fragmentų pašalinimą, pavyzdžiui, centrifuguojant ar ultrafiltruojant; po to baltymai gali būti sukonzentruojami komerciniais baltymų

30 koncentravimui skirtais filtrais; toliau seka ligando

35

atskyrimas nuo kitų pašalinių medžiagų viena ar keliomis stadijomis, pasirenkamomis iš: imunoafininės chromatografijos, jonų mainų chromatografijos (pvz., DEAE ar sorbentai su karboksimetil- ar sulfopropil- grupėmis), chromatografijos su Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lentil lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether-Toyopearl, Butyl Toyopearl, Phenyl Toyopearl, protein-A Sepharose, preparatyvinės SDS-PAGE, atvirkščių fazių HPLC (pvz., silikagelis su alifatinėmis grupėmis) ar gelfiltracijos su Sephadex sorbentais, ir išsodinimo etanolio ar išsodinimo amonio sulfatu. Proteinazių inhibitorius - metilsulfonilfluoridas (PMSE) gali būti naudojamas bet kokioje gryninimo stadijoje, siekiant sumažinti proteolizę.

Kitas šio išradimo objektas yra išskirti antikūnai, sugebantys jungtis su *mpl* ligandu. Geriausi antikūnai *mpl* ligandui išskirti yra monokloniniai (Kohler ir Milstein, *Nature*, **256**:495-497 [1975]; Campbell, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Burdon et al., Eds, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam [1985]; ir Huse et al., *Science*, **246**:1275-1281 [1989]). Geriausi *mpl* ligando išskyrimui antikūnai yra tie, kurie jungiasi su *mpl* ligandu ne mažesniu afiniškumu, nei 10^6 l/moliui. Dar geresni antikūnai, kurių afiniškumas didesnis, nei 10^7 l/moliui. Geriausia, kai antikūnai yra gaunami prieš *mpl* ligandą, turintį vieną iš aukščiau aprašytų efektorinių funkcijų. Antikūnai, sugebantys jungtis su *mpl* ligandu, gali būti sulieti su kitu polipeptidu, ir antikūnas ar sulietas baltymas gali būti naudojamas *mpl* ligando išskyrimui iš šaltinių, kaip aprašyta aukščiau, bei gryninimui. Kitas išradimo objektas yra būdas, kurio pagalba galima nustatyti *mpl* ligandą *in vitro* ir *in vivo*, apimantis antikūnų sąveiką su mėginiu, ypatin-

gai su serumo pavyzdžiais, kuriuose tikimasi rasti ligandą ir susidariusio junginio detekciją, jei toks susidaro.

Kitas išradimo objektas yra išskirta nukleino rūgšties molekulė, koduojanti *mpl* ligandą ar jo fragmentą. Ši nukleino rūgšties molekulė gali būti pažymėta arba nežymėta, ir nukleino rūgšties molekulės seka yra komplementari, galinti hibridizuotis, esant griežtoms arba vidutiniškai griežtoms sąlygoms, su nukleino rūgšties molekule, koduojančia *mpl* ligandą. Geriausia *mpl* ligando nukleino rūgštis yra RNR ar DNR, kuri turi bent 75 % homologijos su molekule, koduojančia biologiškai aktyvų *mpl* ligandą, dar geriau, kai homologija yra bent 80 %, dar geriau - 85 %, dar geriau - 90 % ir pats geriausias atvejis, kai homologija žmogaus *mpl* ligandui yra 95 %. Geriausia išskirta nukleino rūgšties molekulė yra DNR seka, koduojanti biologiškai aktyvų *mpl* ligandą, atrinkta iš: (a) DNR iš žinduolių *mpl* ligando geno regiono (pvz., DNR, kurioje yra nukleotidų seka, pateikta Fig. 1 (SEQ ID Nr.:2) ar jos fragmentai); (b) DNR, sugebančios hibridizuotis su (a) DNR, esant bent vidutiniškai griežtoms sąlygoms; ir (c) DNR, kuri yra išsigimusi lyginant su DNR apibrėžta (a) ar (b). Manoma, kad nauji *mpl* ligandai, aprašyti šiame išradime, gali būti ligandų šeimos nariai ar citokinų šeimos nariai, turintys pakankamai identišką seką, kad jų DNR galėtų hibridizuotis su DNR, pateikta Fig. 1 (SEQ ID Nr.:2) (būtų komplementari ji pati arba jos fragmentai), esant nuo silpnų iki vidutiniškai griežtų, sąlygoms. Taigi, kitas šio išradimo aspektas yra, DNR, kuri hibridizuojausi esant nuo silpnų iki vidutiniškai griežtų, sąlygoms su DNR, koduojančia *mpl* ligandų polipeptidus.

Kitas šio išradimo objektas yra nukleino rūgšties molekulė - kDNR, koduojanti *mpl* ligandą, ir joje esantis replikacijos vektorius, kuris kDNR funkcionaliai

sujungia su kontroliuojančiomis sekomis, atpažįstamomis transformuoto vektoriumi šeimininko. Šis aspektas apima ląsteles-šeimininkus, transformuotus vektoriumi ir būdą, kurio pagalba kDNR apsprendžia *mpl* ligando pro-
5 dukciją transformuotų ląstelių kultūroje, o taip pat *mpl* ligando išskyrimą iš ląstelių kultūros. *mpl* ligandas, paruoštas tokiu būdu, yra praktiškai homogeninis žmogaus *mpl* ligandas. Geriausios ląstelės-šeimininkės *mpl* ligando produkcijai yra Kinietišku žiurkėnių kiau-
10 šidžių (CHO) ląstelės.

Išradimas taip pat apima terapiškai efektyvaus *mpl* ligando kiekio pasirinkimą ir panaudojimą, žinduolių su imunologiniais ar hematopoetiniais susirgimais, ypač trombocitopenija, terapijoje. *Mpl* ligandas gali būti
15 vartojamas kartu su kitais citokinais, ypač su kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi ar interleukinu. Geriausi kolonijas stimuliuojantys faktoriai ar interleukinas yra: kit-ligandas, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 ar
20 IL-11.

III. Išskyrimo principai

Daugelis autorių ilgą laiką manė, kad trombocitų produkcija kontroliuojama keliais, įvairioms hemopoetinių ląstelių atšakoms specifiniais humoraliniais fakto-
25 riaais. Buvo teigiama, kad megakariocitopoezė ir trombo-
poezė reguliuojama dviem skirtingais citokinų aktyvumais, priskiriamais megakariocitų kolonijų stimuliuojančiam faktoriui (meg-CSF) ir trombopoetinui (Williams
30 et al., *J. Cell Physiol.*, 110:101-104 [1982]; (Williams et al., *Blood Cells*, 15:123-133 [1989]; ir Gordon et al., *Blood*, 80:302-307 [1992])). Pagal šią hipotezę, meg-CSF stimuliuoja megakariocitų pirmtakų proliferaciją, o trombopoetinas pirmiausia įtakoja labiau dife-
35 rencijuotų ląstelių brendimą ir galų gale trombocitų

produkcija. Iki 1960 metų tiek meg-CSF, tiek ir trombo-
 poetino indukcija bei aktyvumų pasirodymas gyvūnų ir
 žmogaus plazmoje, serume ir šlapime, esant trombocito-
 penijos epizodams, buvo pakankamai gerai aprašyti
 5 (Odell et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**:428-431
 [1961]; Nakeff et al., *Acta Haematol.*, **54**:340-344
 [1975]; Specter, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**:146-
 149 [1961]; Schreiner et al., *J. Clin. Invest.*,
49:1709-1713 [1970]; Ebbe, *Blood*, **44**:605-608 [1974];
 10 Hoffman et al., *N. Engl. J. Med.*, **305**:533 [1981];
 Straneva et al., *Exp. Hematol.*, **17**:1122-1127 [1988];
 Mazur et al., *Exp. Hematol.*, **13**:1164 [1985]; Mazur et
 al., *J. Clin. Invest.*, **68**:733-741 [1981]; Sheiner et
 al., *Blood*, **56**:183-188 [1980]; Hill et al., *Exp.*
 15 *Hematol.*, **20**:354-360 [1992] ir Hegyi et al., *Int. J.*
Cell Cloning, **8**:236-244 [1990]). Buvo aprašyta, kad šie
 aktyvumai yra specifiniai tam tikrai hemopoetinių
 ląstelių atšakai ir skyrėsi nuo žinomų citokinų akty-
 vumų (Hill R. J. et al., *Blood*, **80**:346 [1992];
 20 Erickson-Miller C.L. et al., *Brit. J. Haematol.*,
84:197-203 [1993]; Straneva J. E. et al., *Exp. Hematol.*
20:4750 [1992] ir Tsukada J. et al., *Blood* **81**:866-867
 [1993]). Bet pastangos išgryninti meg-CSF ar trombopoet-
 iną iš trombocitopeninės plazmos ar šlapimo buvo
 25 nesėkmingos.

Remiantis aukščiau minėtais trombocitopeninės
 plazmos tyrimais, mes nustatėme, kad aplastinių kiaulių
 plazma (APP), gauta iš apšvitintų kiaulių, stimuliuoja
 žmogaus megakariocitopoezę *in vitro*. Mes nustatėme, kad
 30 šis stimuliuojantis aktyvumas panaikinamas tirpiu
 ekstraląstelinio c-mpl domenu, o tai patvirtina, kad
 APP yra potencialus ieškomo mpl ligando (ML) šaltinis.
 Mes sėkmingai išgryninome mpl ligandą iš APP, ir nusta-
 čius mpl ligando amino rūgščių liekanų seką, buvo gali-
 35 ma išskirti pelės, kiaulės ir žmogaus ML baltymo kDNR.

Šie ML baltymai pasižymi sekų homologija su eritropoetinu ir turi kaip meg-CSF aktyvumą, taip ir į trombo-citopoetinę panašų aktyvumą.

1. *mpl* ligando gryninimas iš plazmos ir identifikavimas

5 Kaip buvo pažymėta aukščiau, iš įvairių šaltinių gautoje aplastinėje plazmoje buvo aptiktas aktyvumas, stimuliuojantis hematopoezę *in vitro*, bet nebuvo iš-skirtas iš plazmos joks hemotopoezę stimuliuojantis faktorius. Vienas iš aplastinės plazmos šaltinių yra
10 apšvitintų kiaulių plazma. Ši aplastinių kiaulių plazma (APP) stimuliuoja žmogaus hemopoezę *in vitro*. Siekiant nustatyti, ar APP yra *mpl* ligandas, buvo matuojamas ³H-timidino įsijungimas į Ba/F3 ląsteles, trans-fekuotas žmogaus *mpl* P (Ba/F3-*mpl*). Šio metodo eiga
15 pateikta Fig. 2. APP stimuliuoja ³H-timidino įsijun-gimą į Ba/F3-*mpl* ląsteles, bet ne į kontrolines Ba/F3 ląsteles (t.y., netransfekuotas žmogaus *mpl* P). Papil-dant, jokio aktyvumo nebuvo pastebėta, tyrimus atlie-kant su normalių kiaulių plazma. Šie rezultatai parodo,
20 kad APP yra faktorius arba faktoriai, kurie perduoda proliferacijos signalą per *mpl* receptorių ir tai gali būti natūralus ligandas šiam receptoriui. Tai buvo patvirtinta apdorojus APP tirpiu *mpl*-IgG, kuris blokuo-davo stimuliuojantį APP efektą ląstelėms Ba/F3-*mpl*.

25 Šis APP faktorius yra baltymas, nes paveikus APP pronaze, DTT ar pakaitinus, buvo prarandamas APP stimu-liuojantis aktyvumas (Fig. 3). Aktyvumas nebuvo praran-damas, dializuojant APP. Šis faktorius stabilus, esant žemoms pH reikšmėms (2 valandas pH 2,5), buvo parodyta,
30 kad šis faktorius yra sorbuojamas keliais lectin-afini-niais sorbentais, o tai reiškia, kad šis baltymas yra glikozilintas. Sekantis etapas, nustatant šio fakto-

riaus struktūrą ir identiškumą, buvo afininis šio faktoriaus išgryninimas iš APP, naudojant *mpl*-IgG chimera.

APP buvo apdorojama taip, kaip aprašyta Pavyzdžiuose 1 ir 2. Trumpai, *mpl* ligandas buvo gryninamas naudojant hidrofobinės sąveikos chromatografiją (HIC), chromatografiją su imobilizuotais dažais ir *mpl*-afininę chromatografiją. Aktyvumo išeiga kiekvienoje chromatografijos stadijoje pateikta Fig. 4, o kiekvienos stadijos išgryninimo faktoriai (kartais) pateikti Lentelėje 1. Bendra faktoriaus išeiga po *mpl*-afininės chromatografijos buvo apie 10 %. Aktyvumo pikas (F6) po *mpl*-afininės chromatografijos turėjo $9,8 \times 10^6$ V/mg specifinį aktyvumą. Gryninant 5 litrus APP, gryninimo faktorius buvo 4×10^6 kartai (nuo 0,8 V/mg iki $3,3 \times 10^6$ V/mg), baltymų kiekis sumažėjo 83×10^6 kartų (nuo 250 g iki 3 μ g). Mūsų nustatytas ligando specifinis aktyvumas po *mpl*-afininės chromatografijos buvo $\sim 3 \times 10^6$ V/mg.

LENTELĖ 1

mpl ligando gryninimas

Mėginys	Tūris, ml	Baltymo koncentracija, mg/ml	V/ml	Vienetai	Specifinis aktyvumas, V/mg	Išeiga, %	Išgryninimo faktorius, kartai
APP	5000	50	40	200000	0,8	-	1
Phenyl	4700	0,8	40	200000	50	94	62
Blue-Seph.	640	0,93	400	256000	430	128	538
<i>mpl</i> (μ l) (Fr. 5-7)	12	5×10^{-4}	1666	20000	3300000	10	4100000

Baltymo koncentracija buvo nustatoma Bradford metodu. Baltymo koncentracijos frakcijose (5-7) nuo *mpl*-kolonėlės buvo nustatoma pagal dėmių intensyvumą, dažant SDS PAGE gelį sidabru. Vienas aktyvumo vienetas lygus koncentracijai, kuriai esant pasiekama 50 % maksimalaus Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferacijos stimuliavimo.

Elijuotos nuo *mpl* afininės kolonėlės frakcijos buvo analizuojamos SDS PAGE (4-20 %, Novex gel) redukuojančiomis sąlygomis. Buvo nustatyta, kad mėginiuose yra keletas baltymų (Fig. 5). Intensyvesnės baltymų juostos dažytuose sidabru SDS PAGE geliuose buvo ties molekulinėmis masėmis 66000, 55000, 30000, 28000 ir

18000-22000D. Siekiant nustatyti, kuris iš šių baltymų stimuliuoja Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferaciją, baltymai buvo eliuuojami iš gelio, kaip aprašyta Pavyzdyje 2.

Šiuo eksperimentu buvo nustatyta, kad didesniu aktyvumu pasižymėjo eliuuoti iš gelio baltymai iš molekulinų masių juostos 28 - 32 kD, mažesniu aktyvumu pasižymėjo baltymai iš molekulinų masių juostos 18 - 22 kD (Fig. 6). Vieninteliai šiuose molekulinų masių intervaluose matomi baltymai turėjo 30, 28, ir 18-22 kD molekulinės masės. Siekiant nustatyti šių baltymų (t.y., juostos 30, 28, ir 18-22 kD) amino rūgščių liekanų seką, šie baltymai buvo pernešami blotuojant ant PVDF membranos ir sekvenuojami, kaip aprašyta Pavyzdyje 3. Baltymų N galo amino rūgščių liekanų seka pateikta Lentelėje 2.

LENTELĖ 2

mpl ligando N galo amino rūgščių liekanų seka

30 kD						(SEQ ID Nr.:30)
1	5	10	15	20	25	
(S) PAPP(A) DPRLNKLRRDD (H/S) VLH (G) RL						
28 kD						(SEQ ID Nr.:31)
1	5	10	15	20	25	
(S) PAPPAXDPRLNKLRRDD (H) VL (H) GR						
18-22 kD						(SEQ ID Nr.:32)
1	5	10				
XPAPPAXDPRLX (N) (K)						

Kompiuterine analize buvo nustatyta, kad tokių N galo baltymo sekų neturi jokie žinomi baltymai. Kadangi visos trys N galų sekos yra tos pačios, tai tikėtina, kad 30 kD, 28 kD ir 18-22 kD molekulinų masių baltymai gali būti vieno naujo baltymo skirtingos formos. Šis baltymas (baltymai) kaip tik gali būti natūralus *mpl* ligandas, nes aktyvumas buvo nustatytas toje pačioje SDS PAGE gėlio (4-20 %) srityje (28-32 kD). Be to, dalinai išgrynintas ligandas eliuuojamas 17-30 kD srityje nuo gelfiltracinės Superose 12 (Pharmacia)

kolonėlės. Tikėtina, kad skirtingų molekulinų masių ligando formos gali būti proteinolizės, skirtingo glikozilinio ar kitų post- arba prieštransliacinių modifikacijų rezultatas.

5 Kaip buvo aprašyta ankščiau, antisensinė žmogaus *mpl* RNR panaikina megakariocitopoezę žmogaus kaulų čiulpu kultūroje, praturtintoje CD 34⁺ ląstelėmis-pirm-takais, ir neturi jokios įtakos kitų hemopoetinių ląstelių linijų diferenciacijai (Methia et al., *supra*).
10 Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad *mpl* receptorius gali įtakoti megakariocitų diferenciaciją ir proliferaciją *in vitro*. Tolesniam išsiaiškinimui apie *mpl* ligando įtaką megakariocitopoezei buvo sulyginama APP ir APP be *mpl* ligando įtaka žmogaus megakariocito-
15 poezei *in vitro*. APP įtaka žmogaus megakariocitopoezei buvo įvertinama, naudojant modifikuotus suspensinius megakariocitopoezės tyrimus, aprašytus Pavyzdyje 4. Šiuose tyrimuose žmogaus periferinės kamieninės ląstelės (PSC) buvo paveikiamos APP prieš ir po gryninimo
20 *mpl*-IgG afinine chromatografija. GPIIbIIIa megakariocitopoezės stimuliacija buvo kiekybiškai įvertinama su ¹²⁵J-anti-IIbIIIa antikūnais (Fig. 7). Kaip parodyta Fig. 7, 10 % APP sukelia apie tris kartus didesnę stimuliaciją, tuo metu, kai APP be *mpl* ligando neturi
25 jokios įtakos. Svarbu, kad APP be *mpl* ligando neindukuoja ląstelių Ba/F3-*mpl* proliferacijos.

Kitame tyrime tirpus žmogaus *mpl*-IgG buvo pridedamas 0, 2 ir 4 diena į kultūras, kuriose buvo 10 % APP, kad neutralizuotų APP stimuliacijos efektą žmogaus
30 megakariocitopoezei (Fig. 8). Šie rezultatai įrodo, kad *mpl* ligandas dalyvauja žmogaus megakariocitopoezės reguliavime, todėl *mpl* ligandas gali būti naudingas, gydant trombocitopeniją.

2. *mpl* ligando molekulinis klonavimas

Remiantis galine amino rūgščių seka, gauta iš 30 kD, 28 kD ir 18-22 kD baltymų (žr. Lentelę 2), du išsigimę oligonukleotidai buvo panaudoti kiaulių genomines DNR amplifikuoti PCR būdu. Tai buvo atlikta remiantis tuo, jog, jeigu galinė amino rūgščių seka yra koduojama vienintelio egzono, tada teisingas PCR produktas turėtų būti 69 bp ilgio. Tokio ilgio DNR fragmentas buvo gautas ir klonuotas į pGEMT. Oligonukleotidinės PCR pradmenų sekos ir trys gauti klonai yra parodyti Pvz. 5. Peptido amino rūgščių seka (PRLLNKLLR [SEQ ID Nr.: 33]), koduojama tarp PCR pradmenų, buvo identiška galinei baltymo amino sekai gautai, sekvenuojant kiaulių ligandą (žiūrėti 9-17 amino rūgščių liekanas 28 ir 30 kD kiaulių baltymo sekas, pateiktas aukščiau).

Sintetinis oligonukleotidas, paremtas PCR fragmento seka, buvo panaudotas žmogaus genomines DNR bibliotekos skryningui. 45 bazių oligonukleotidas, pavadintas pR45, buvo susintetintas, remiantis PCR fragmento seka. Šis oligonukleotidas turi tokią seką:
 5' GCC GTG AAG GAC GTG GTC GTC ACG AAG CAG
 TTT ATT TAG GAG TCG 3' (SEQ ID Nr.: 34)

Šis dezoksionukleotidas buvo panaudotas žmogaus genomines DNR bibliotekos skryningui λgem 12, esant negriežtoms hibridizacijos ir atplovimo sąlygoms, pagal Pavyzdį.6. Buvo atrinkti teigiami klonai, jie išgryninti ir analizuoti restriktuojant bei naudojant Southern blotingą. 390 bp EcoRI-XbaI fragmentas, kuris hibridizuoja su 45 bazių porų ilgio fragmentu, buvo klonuotas į pBluescript SK-. Šio klono DNR sekos nustatymas patvirtino, jog buvo išskirta DNR seka, koduojanti žmogaus homologą kiaulių *mpl* ligando dalį. Žmogaus DNR seka ir ją atitinkanti amino rūgščių seka yra parodyta Pieš.9 (SEQ ID Nr.: 3 ir 4). Numatomos intronų po-

zicijos genomineje sekoje taip pat yra pažymėtos rodyklėmis, ir nustatytas numanomas egzonas ("egzonas 3").

Remiantis žmogaus "egzono 3" seka (Pavyzdys.6) buvo susintetinti oligonukleotidai, atitinkantys 3' ir
5 5' egzono sekos galus. Šie du pradmenys buvo naudojami PCR reakcijose, kaip matricą naudojant kDNR, gautą iš ivairių žmogaus audinių. Teisingo PCR produkto laukiamas ilgis buvo 140 bp. Išanalizavus PCR produktus 12% poliakrilamidiniame gelyje, laukiamo dydžio DNR fragmentas buvo nustatytas kDNR bibliotekose, paruoštose iš
10 suaugusio žmogaus inkstų, embriono inkstų 293 ląstelių ir kDNR paruoštose iš žmogaus embriono kepenų.

Embriono kepenų kDNR biblioteka (7×10^6 klonų) λ DR2 toliau buvo analizuojama su tuo pačiu 45 bazių oligonukleotidu, kuris buvo naudotas žmogaus genominės bibliotekos ir embriono kepenų kDNR bibliotekos skryninge, esant negriežtoms hibridizacijos sąlygoms. Buvo atrinkti teigiami klonai, trombocitai išgryninti ir įterptos sekos dydis buvo analizuojamas PCR būdu. Vienas klonas
15 su 1.8 kbp intarpu buvo atrinktas tolesnei analizei. Naudojant procedūras, aprašytas Pavyzdyje.7, buvo gauta žmogaus *mpl* ligando (hML) nukleotidų seka bei iš jos išvestinė amino rūgščių liekanų seka. Šios sekos yra pateiktos Fig. 1 (SEQ ID Nr.: 1 ir 2).

25

3. Žmogaus *mpl* ligando (hML) struktūra

Žmogaus *mpl* ligando (hML) kDNR seka (Fig. 1.[SEQ ID Nr.: 2]) turi 1774 nukleotidus ir poli(A)uodegą. Tai sudaro 215 nukleotidų nuo netransliuojamos sekos 5' galo ir 498 nukleotidus nuo 3' netransliuojamos srities. Tikėtinas iniciacijos kodonas, esantis 216-218
30 nukleotidų srityje yra konsensinė seka, tinkama eukariotinei transliacijos iniciacijai. Atviras skaitymo rėmelis yra 1059 nukleotidų ilgio ir koduoja 353 amino rūgščių polipeptidą, pradedant 220-tu nukleotidu. Iš-
35 vestinės amino rūgščių sekos N-galas yra labai hidro-

fobinis ir turbūt atitinka signalinį peptidą. Kompiuterinė amino rūgščių sekos analizė (von Heijne et.al., *Eur.J.Biochem.*, 133:17-21[1983]) nurodo potencialią skėlimo vietą signalinei peptidazei tarp 21 ir 22 amino rūgščių liekanų. Perskėlus šioje pozicijoje, susidarytų subrendęs 332 amino rūgščių liekanų polipeptidas, prasidedantis N galine seka, kurią turi *mpl* ligandas, išgrynintas iš kiaulių plazmos. Išvestinis neglikozilinto 332 amino rūgščių liekanų ligando molekulinis svoris yra apie 38 kD. Yra 6 potencialios N-glikozilavimo vietos ir 4 cisteino liekanos.

mpl ligando sekos palyginimas su Genų banko sekų duomenų baze parodė 23% identiškumą tarp subrendusio žmogaus *mpl* ligando 153 amino galinių liekanų ir žmogaus eritropoetino (Fig. 10 [SEQ ID Nr.: 6 ir 7]). Turint galvoje konservatyvius pakeitimus, šis hML regionas parodo 50% panašumą su žmogaus eritropoetinu (hEPO). Ir hEPO, ir hML turi keturis cisteinus. Trys iš keturių cisteinų yra konservatyvūs hML, įskaitant pirmąjį ir paskutinįjį cisteinus. Kryptingosios mutagenės eksperimentai parodė, kad pirmas ir paskutinis eritropoetino cisteinai formuoja disulfidinę jungtį, kuri yra funkciškai reikalinga (Wang, F.F., et.al., *Endocrinology* 116: 2286-2292[1983]). Analogiškai pirmas ir paskutinis hML cisteinai taip pat gali formuoti kritinį disulfidinį ryšį. hML neturi konservatyvių glikozilavimo vietų. Visos potencialios hML N- susijusios glikozilavimo vietos yra lokalizuotos hML polipeptido C galo pusėje.

Kaip ir hEPO, hML irNR neturi konsensinės poliadenilavimo sekos AAUAAA, nei reguliatorinio elemento AUUUA, kuris yra daugelio citokinių 3'netransliuojamoje srityje ir kuris, manoma, turi įtakos mNRN stabilumui (Shawet al., *Cell*, 46:659-667 [1986]). Northern blotavimo analizė rodo nedidelį kiekį vienintelio 1.8 kbp

hML RNR transkripto tiek embriono, tiek suaugusių žmonių kepenyse. Po ilgo ekspozicijos laiko silpna tokio pat dydžio juostelė gali būti nustatyta suaugusių žmonių kepenyse. Analogiškai žmogaus eritropoetinas yra ekspresuojamas embriono kepenyse, o taip pat suaugusio žmogaus inkstuose ir kepenyse, atsakant į hipoksiją (Jacobs et. al., *Nature*, 313: 804-809 [1985] and Bondurant et. al., *Molec.Cell.Biol.*, 6:2731-2733 [1986]).

10 HML C-galinio rajono svarba tebėra aiškinama. Remiantis šešių potencialių N-susieto glikozilinimo vietų buvimu ir ligando sugebėjimu rištis prie lectin-afininių kolonų, panašu, jog šis hML rajonas yra glikozilintas. Kai kuriuose eliuacijos iš gelio eksperimentuose mes pastebėjome, jog aktyvumas yra aptinkamas ties molekuline mase 60000 D, o tai gali būti pilna glikozilinta molekulė. Tuo būdu C-galinė sritis gali stabilizuoti ir padidinti cirkuliuojančio hML gyvavimo pusperiodį. Eritropoetino atveju neglikozilinta forma turi pilną biologinį aktyvumą *in vitro*, bet turi žymiai sumažintą plazmos gyvavimo pusperiodį, lyginant su glikozilintu eritropoetinu (Takeuchi et.al., *J. Biol. Chem.*, 265: 12127-12130 [1990]; Narhi et.al., *J. Biol. Chem.*, 266: 23022-23026 [1991] ir Spivack et al., 25 *Blood*, 7:90-99 [1989]). hML C-galiniis domenais turi dvi bazines amino rūgščių liekanų sekas [Arg-Arg motyvai 153-154 ir 245-246 pozicijose], kurios gali tarnauti kaip potencialios procesingo vietos. Skeliant šiose vietose gali susidaryti 30, 28, ir 18-22kD ML, išskirto iš APP, formos. Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ sekos yra iš karto po domeno, panašaus į eritropoetiną, kuris yra ML. Remiantis šiais pastebėjimais, galima pasakyti, kad pilnas ML gali būti signalinis peptidas, kuris patiria ribotą proteolizę, tam kad susidarytų subrendęs ligandas.

4. Žmogaus *mpl* ligando izoformos ir variantai

Izoformos arba alternatyviai sujungtos žmogaus *mpl* ligando formos buvo nustatytos PCR būdu suaugusio žmogaus kepenyse. Trumpai tariant, pradmenys buvo susintetinti atitinkamai kiekvienam galui, taip pat ir pasirinktiems vidiniams hML koduojančios sekos regionams. Šie pradmenys buvo naudojami RT-PCR, norint padauginti suaugusio žmogaus kepenų RNR, kaip aprašyta Pavyzdyje 10. Be pilno ilgio formos, priskiriamos hML, trys kitos formos, hML2, hML3 ir hML4 buvo pastebėtos arba išvestos. Išvestinės visų keturių subrendusių izoformų amino rūgščių sekos yra parodytos Fig. 11 (SEQ ID Nr.: 6,8,9 ir 10). hML3 turi 116 nukleotidų deleciją 700-toje pozicijoje, o tai duoda amino rūgščių deleciją ir rėmelio poslinkį. kDNR dabar koduoja subrendusį polipeptidą, kuris turi 265 amino rūgštis ir skiriasi nuo hML sekos ties 139 amino rūgšties liekana. Galiausiai, hML4 turi 12 nukleotidų deleciją po 618-tos nukleotido pozicijos (taip pat randama pelės ir kiaulės sekose [žiūr. žemiau]) ir 116 bazių porų deleciją, randamą hML3. Nors nebuvo išskirtų iš žmogaus klonų tik su 12 bazių porų delecija (po 619 nukleotido) (priskiriama hML2), panašu, jog ši forma egzistuoja, kadangi tokia izoforma buvo identifikuota pelėje ir kiaulėje (žr. žemiau), ir kadangi tai buvo identifikuota kartu su 116 nukleotidų delecija hML4.

Kartu ir pakaitinis hML variantas, kuriame dviejų bazinių amino rūgščių liekanų Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ seka buvo pakeista į dvi alanino liekanas, ir "EPO-domenas", sutrumpinta hML forma, buvo sukonstruotos, norint nustatyti, ar pilno ilgio ML yra būtinas biologiniam aktyvumui. Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ dviejų bazinių amino rūgščių liekanų sekos pakaitinis variantas, vadinamas hML(R153A, R154A), buvo sukonstruotas PCR būdu, kaip aprašyta

Pvz.10. "EPO-domeno" sutrumpinta forma, hML₁₅₃, taip pat buvo gauta PCR būdu, įvedant stop kodoną po Arg₁₅₃.

5. Žmogaus rekombinantinio *mpl* ligando (rhML) ekspresija laikinai transfekuotuose žmogaus embriono inkstų (293) ląstelėse

Norint patvirtinti, kad klonuota žmogaus kDNR koduoja *mpl* ligandą, ligandas buvo ekspresuotas žinduolių 293 ląstelėse, naudojant ekspresijos vektorius pRK5-hML ar pRK5-hML₁₅₃, kuriuose *mpl* ligando kDNR ekspresiją kontroliuoja ankstyviausias citomegalo viruso promotorius. Buvo parodyta, kad supernatantai, kuriuose augo laikinai transfekuotos žmogaus embriono 293 ląstelės, stimuliuoja ³H-timidino įsijungimą į Ba/F3-*mpl* ląsteles, bet ne į motinines Ba/F3 ląsteles (Fig. 12A). Terpė, kondicionuota 293 ląstelėmis, transfekuotomis vien pRK vektoriumi, tokiu aktyvumu nepasižymėjo. Pridėjus į terpę *mpl*-IgG, ląstelių stimuliacija inhibuojama (duomenys nepateikti). Šie rezultai įrodo, kad klonuota kDNR koduoja funkcionalų žmogaus ML (hML).

Siekiant išaiškinti, ar "EPO-domenas" vienas gali sąveikauti su *mpl* ir jį aktyvuoti, sutrumpinta hML forma - rhML₁₅₃ - buvo ekspresuota 293 linijos ląstelėse. Transfekuotų ląstelių kondicionuota terpė pasižymėjo tokiu pat aktyvumu, kaip ir terpė nuo ląstelių, transfekuotų pilno ilgio hML genu (Fig. 12A). Tai parodo, kad ML domenas, esantis baltymo C gale, nereikalingas sąveikai su c-*mpl* bei jo aktyvacijai.

6. *mpl* ligandas stimuliuoja megakariocitopoezę ir trombopoezę.

Abi - pilno ilgio rhML ir sutrumpinta rhML₁₅₃ - rekombinantinio hML baltymo formos stimuliuoja megakariocitopoezę *in vitro* (Fig. 12B). Šis efektas stebimas

nesant jokių kitų egzogeninių hemopoetinių augimo faktorių. Išskyrus IL-3, ML buvo vienintelis hemopoetinis augimo faktorius, pasižymintis tokiu aktyvumu. Testuojant atskirai IL-11, IL-6, IL-1, eritropoetinas, G-CSF, IL-9, LIF, kit-ligandas (KL), M-CSF, OSM ir GM-CSF neturėjo įtakos megakariocitopoezei (duomenys nepateikti). Šie rezultatai rodo, kad ML pasižymi megakariocitus stimuliuojančiu aktyvumu ir pabrėžia jo vaidmenį megakariocitopoezės reguliacijoje.

Pelių atsakomosios trombocitozės metodu parodyta, kad trombocitopeniškų gyvūnų plazmoje esantys trombopoetiškai aktyvūs faktoriai stimuliuoja trombocitų produkciją (McDonald, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **14**:1006-1001 [1973] ir McDonald, et al., *Scand. J. Haematol.*, **16**:326-334 [1976]). Šiame modelyje pelėms suleidus specifinę antitrombocitinę antiserumą, sukeliami ūmi trombocitopenija, kuri savo ruožtu iššaukia nuspėjamą atsakomąją trombocitozę. Tokios pelės daug geriau, nei normalios reaguoja į egzogeninį trombopoetinį aktyvumą (McDonald, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **14**:1006-1001 [1973]), lygiai taip, kaip pelės po hipoksijos daug geriau reaguoja į eritropoetiną, nei sveikos (McDonald, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **77**:134-143 [1971]). Norint išaiškinti ar rML gali stimuliuoti trombocitų produkciją *in vivo*, pelėms, kurioms buvo sukurta atsakomoji trombocitozė, buvo suleistas nevisiškai išgrynintas rhML. Po to buvo įvertintas trombocitų skaičius ir ^{35}S įsijungimas į trombocitus. Suleidus pelėms 64000 arba 32000 vienetų rML, pasiektas žymus trombocitų produkcijos padidėjimas, kuris pasireiškia trombocitų skaičiaus padidėjimu ~20 %, lyginant su kontroline grupe ($p = 0,0005$ ir $0,0001$, atitinkamai) ir ^{35}S įsijungimo į trombocitus padidėjimu ~40 % ($p = 0,003$); kontrolinėms pelėms buvo suleidžiamas vien tirpiklis (Fig. 12C). Gautas stimuliacijos lygis panašus į stimuliacijos

lygi, kuri šioje sistemoje rodo IL-6 (duomenys nepateikti). Leidžiant 16000 vienetų rML, žymios trombocitų stimuliacijos nebuvo. Šie rezultatai rodo, kad ML stimuliuoja trombocitų produkciją ir preparato efektas priklauso nuo jo dozės. Tokiu būdu, ML aktyvumas atitinka trombopoetino aktyvumą.

293 linijos ląstelės buvo taip pat transfekuotos kitų hML izoformų konstruktais, aprašytais aukščiau, ir transformantų kondicionuotų terpių aktyvumas buvo analizuotas Ba/F3-*mpl* proliferacijos metodu (žiūr. Fig. 13). hML2 ir hML3, tiriant šiuo metodu, buvo neaktyvus, tačiau hML(R153A, R154A) aktyvumas buvo panašus į hML ir hML₁₅₃ aktyvumus. Tai rodo, kad Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ dviejų bazinių amino rūgščių liekanų vieta neturi nei teigiamos, nei neigiamos įtakos ML aktyvumui.

7. Megakariocitopoezė ir *mpl* ligandas

Manoma, kad megakariocitopoezė reguliuojama įvairiose ląstelių vystymosi stadijose (Williams et al., *J. Cell Physiol.*, **110**:101-104 [1982] ir Williams et al., *Blood Cells*, **15**:123-133 [1989]). Šis požiūris remiasi žinomu faktu, kad vieni hemopoetiniai faktoriai stimuliuoja megakariocitų pirmtakų proliferaciją, tuo tarpu kiti, matyt, įtakoja jų brendimą. Išradime pateikti rezultatai rodo, kad ML veikia ir proliferaciją, ir brendimą. Yra eksperimentinių duomenų, kad ML stimuliuoja megakariocitų pirmtakų proliferaciją. Pirma, APP gali stimuliuoti megakariocitų proliferaciją ir brendimą *in vitro*, ir abu efektai visiškai inhibuojami pridėjus *mpl*-IgG (Fig. 7 ir 8). Antra, *c-mpl* antisensiniai oligonukleotidai inhibuoja megakariocitų kolonijų formavimąsi (Methia et al., *Blood*, **82**:1395-1401 [1993]). Tas efektas, kad *c-mpl* gali perduoti proliferacijos signalą į ląsteles, kurias jis transfekavo, taip pat įrodo, kad ML stimuliuoja proliferaciją (Skoda et al.,

EMBO, 12:2645-2653 [1993] ir Vigon et al., *Oncogene*, 8:2607-2615 [1993]). Akyvaizdi c-mpl ekspresija visose megakariocitų diferencijacijos stadijose (Methia et al., *Blood*, 82:1395-1401 [1993]) ir rekombinantinio ML sugebėjimas greitai stimuliuoti trombocitų produkciją in vivo nurodo, kad ML taip pat įtakoja megakariocitų brendimą. Rekombinantinis ML atveria galimybę tiksliai įvertinti jo vaidmenį megakariocitopoezės ir trombocitopoezės reguliacijoje, o taip pat galima jo įtaką kitų atšakų hemopoetinėms ląstelėms.

8. Žmogaus mpl ligando (TPO) geno išskyrimas

TPO geno žmogaus genomines DNR klonai buvo išskirti, atliekant žmogaus genomines bibliotekas, esančias λGem12 su pR45, skryningą, kai yra negriežtos sąlygos arba, esant griežtoms sąlygoms su fragmentu, atitinkančiu žmogaus kDNR 3'dalį, koduojančią mpl ligandą. Buvo išskirti du persidengiantys lambda klonai, turintys 35kb. Du persidengiantys fragmentai (BamHI ir EcoRI), turintys pilną TPO geną, buvo klonuoti ir sekvenuoti (žr. Fig. 14A, 14B ir 14C).

Žmogaus genas turi 6 egzonus 7 kbp ilgio genomineje DNR. Jungtys visose egzono/introno susijungimo vietose atitinka konsensinį motyvą, nustatytą žinduolių genams (Shapiro, M.B., et.al., *Nucl.Acids Res.* 15:7155 [1987]). Egzonas 1 ir egzonas 2 turi 5' netransliuojamą seką ir signalinio peptido pirmas keturias amino rūgštis. Sekretinio signalo liekana ir pirmos 26 subrendusio baltymo amino rūgštys yra koduojamos egzone 3. Pilnas C-galinis domenai, 3'netransliuojamas domenai, o taip pat ir apie 50 amino rūgščių iš domeno, panašaus į eritropoetiną, yra koduojami egzone 6. Keturios amino rūgštys, dalyvaujančios delecijoje, stebimoje hML-2 (hTPO-2), yra koduojamos 6 egzono 5'gale.

Žmogaus genominės DNR analizė, naudojant Sautherno blotavimą, nurodo, jog TPO genas yra vienintelėje kopijoje. Geno chromosominė lokalizacija yra nustatoma fluorescentine *in situ* hibridizacija (FISH), naudojama
5 3q27-28 chromosomai.

9. TPO ekspresija ir gryninimas iš 293 ląstelių

ML arba TPO paruošimas ir gryninimas iš 293 ląstelių yra detaliai aprašytas Pavyzdyje 19. Trumpai tariant, kDNR, atitinkanti TPO pilną atvirą skaitymo
10 rėmelį, buvo gauta PCR būdu, naudojant pRK5-hmpl I. PCR produktas buvo išvalytas ir klonuotas į plazmidę pRK5tkneo, kuri suskaldyta restrikazėmis ClaI ir XbaI (pRK5 vektorius yra modifikuotas ekspresuoti atsparumo neomicinui geną, esant timidin-kinazės promotoriaus
15 kontrolei), norint gauti vektorių pRK5tkneo.ORF (vektorių, koduojantį pilną atvirą skaitymo rėmelį).

Antrasis vektorius EPO homologiniam domenui buvo gautas tokiu pat būdu, bet naudojant skirtingus PCR pradmenis, norint gauti galutinę konstrukciją, vadinamą
20 pRK5-tkneoEPO-D.

Šios dvi konstrukcijos buvo transfekuotos į žmogaus embrionines inkstų ląsteles kalcio fosfatiniu metodu ir buvo atrinkti neomicinui atsparūs klonai, kurie buvo auginami. ML₁₅₃ arba ML₃₃₂ ekspresija kondi-
25 cionuotoje terpėje nuo šių klonų buvo nustatyta, naudojant Ba/F3-*mpl* proliferacijos bandymą. rhML₃₃₂ gryninimas buvo atliekamas, kaip aprašyta Pavyzdyje 19. Trumpai tariant, terpė su 239-rhML₃₃₂ buvo naudojama Blue-Sepharose (Pharmacia) kolonoje, kuri buvo vėliau
30 plaunama buferiniu tirpalu, turinčiu 2M karbamido. Baltymai buvo eliujuoti buferiniu tirpalu, turinčiu 2M karbamido ir 1M NaCl. Po Blue-Sepharose apjungtos eliujuotos frakcijos buvo tiesiogiai užnešamos ant WGA-Sepharose kolonos, praplautos su 10 kolonos tūrių bufe-

rinio tirpalo, turinčio 2M karbamido ir 1 M NaCl ir eliujuota su tuo pačiu buferiniu tirpalu, turinčiu 0,5 M N-acetil-D-glukozamino. WGA-Sepharose eliuatas buvo užneštas ant C4-HPLC kolonos (Synchrom, Inc.) ir eliujuotas propanolio gradientu. Išvalytas 293-rhML₃₃₂ SDS-PAGE juda kaip plati juosta 68-80 kD srityje (žr. Fig. 15).

rhML₁₅₃ gryninimas gali taip pat būti atliktas kaip aprašyta Pavyzdyje 19. Trumpai tariant, terpė su 293-rhML₁₅₃ buvo chromatografuojama ant Blue-Sepharose, kaip aprašyta rhML₃₃₂. Blue Sepharose eliuatas iškart buvo perneštas ant *mpl* afininės kolonėlės, kaip aprašyta aukščiau. RhML₁₅₃, eliujuotas nuo *mpl* afininės kolonėlės buvo išgrynintas iki homogeniškumo, naudojant C4-HPLC koloną tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir buvo naudota rhML₃₃₂ valyme. Išgrynintas rhML₁₅₃ SDS-PAGE išsiskiria į dvi pagrindines ir dvi minorines juostas, kurių molekulinė masė 18 -22 kD (žr. Fig. 15).

10. Pelės *mpl* ligandas

DNR fragmentas, atitinkantis žmogaus *mpl* ligando koduojančią sritį, buvo gautas PCR būdu, išgrynintas iš gelio ir pažymėtas radioaktyvia žyme, naudojant ³²P-dATP ir ³²P-dCTP. Šis mėginys buvo panaudotas atrinkti 10⁶ klonų iš pelės kepenų kDNR bibliotekos, esančių λGT10. Buvo išskirtas ir sekvenuotas pelės klonas (Fig. 16 [SEQ ID Nr: 12 ir 13]), turintis 1443 bazių porų intarpą. Numanomas iniciacijos kodonas, esantis 138-141 nukleotidų srityje, buvo konsensinėje sekoje, tinkamoje eukariotinei transliacijos iniciacijai (Kozak, M. *J. Cell Biol.*, **108**:229-241 [1989]). Ši seka sudaro atvirą skaitymo rėmelį iš 1056 nukleotidų, kuris apsprendžia pirminį transliacijos produktą iš 352 amino rūgščių. Ši atvirą skaitymo rėmelį supa 137 nukleotidai

nuo netransliuojamos sekos 5'galo ir 247 nukleotidai
nuo netransliuojamos sekos 3' galo. Nėra poli(A) uode-
gos, einančios po 3' netransliuojamos srities, o tai
reiškia, jog klonas tikriausiai nėra pilnas. Numanomos
5 amino rūgščių sekos N galas yra ypač hidrofobinis ir
tai, turbūt, yra signalinis peptidas. Kompiuterine ana-
lize (von Heijne, G. *Eur. J. Biochem.* **133**:17-21[1983])
buvo nustatyta potenciali skėlimo signalinei peptidazei
vieta tarp 21 ir 22 liekanų. Perskėlus šioje vietoje,
10 susidaro 331 amino rūgšties subrendęs polipeptidas
(35kD), žymimas kaip mML₃₃₁ (arba mML2, dėl priežasčių
aprašytų žemiau). Seka turi keturis cisteinus, visus
konservatyvius žmogaus baltymo sekoje, ir septynias
potencialias N-glikozilinimo vietas, 5 iš kurių yra
15 konservatyvios žmogaus baltymo sekoje. Vėl, kaip su
hML, visos septynios potencialios N-glikozilinimo vie-
tos yra baltymo C galo pusėje.

Lyginant su žmogaus ML, buvo stebimas abiejų ML
nukleotidų sekų ir išvestinių amino rūgščių sekų žymus
20 panašumas "EPO-domenuose". Tačiau palyginus žmogaus ir
pelės ML išvestines amino rūgščių sekas, pasirodė, jog
pelės ML seka turi tetrapeptidinę deleciją tarp 111-114
liekanos, atitinkančią 12 nukleotidų deleciją po 618
nukleotido, kuri yra matoma žmogaus (žr. aukščiau) ir
25 kiaulės (žr. žemiau) kDNR. Atitinkamai, buvo išanali-
zuoti papildomi klonai galimų pelės ML izoformų nusta-
tymui. Vienas klonas, koduojantis 335 amino rūgščių
polipeptidą turi "praleistą" tetrapeptidą LPLQ. Tiki-
masi, jog ši forma yra pilnas pelės ML ir jis vadinamas
30 mML arba mML₃₃₅. mML nukleotidinė ir išvestinė amino
rūgščių sekos yra pateiktos Fig. 17 (SEQ ID Nr.: 14 ir
15). Šis kDNR klonas turi 1443 bazių poras, kurios yra
iki poli(A) uodegos. Tai apima atvirą skaitymo rėmelį
iš 1068 bp, apsuptą 134 bazių nuo netransliuojamos
35 sekos 5'galo ir 241 bazės nuo netransliuojamos sekos 3'
galo. Numanomas iniciacijos kodonas yra tarp 138-140

nukleotidų. Atviras skaitymo rėmelis koduoja išvestinį 356 amino rūgščių liekanų baltymą, kurio pirmosios 21 amino rūgščių liekanos yra ypač hidrofobinės ir, panašu, jog jos yra sekrecijos signalas.

5 Galų gale, buvo išskirtas trečias pelės baltymo klonas, nustatyta seka ir parodyta, kad jis turi 116 nukleotidų deleciją, atitinkančią hML3. Ši pelės baltymo izoforma pavadinta mML3. Šių dviejų izoformų išvestinių amino rūgščių sekų palyginimas yra pateiktas
10 Fig. 18 (SEQ ID Nr.: 9 ir 16).

Žmogaus ir pelės ML amino rūgščių sekos panašumas (Fig. 19 [SEQ ID Nr.: 6 ir 17]) yra 72%, bet ši homologija nėra vienodai paskirstyta. Sritis, vadinama "EPO-domenu" (žmogaus sekos amino rūgštys 1-153 ir 1-149
15 pelės sekos) yra labiau konservatyvi (86% homologijos), negu baltymo C-galo sritis (62% homologijos). Tai gali reikšti, kad tiksliai "EPO-domenas" yra svarbus baltymo biologiniam aktyvumui. Įdomu, kad iš dviejų bazinių amino rūgščių liekanų motyvų, randamų hML, tiksliai
20 dviejų bazinių amino rūgščių liekanų motyvas, esantis iškart po "EPO-domeno" (153-154 liekanos) žmogaus ML sekoje, yra pelės ML sekoje. Tai atitinka prielaidą, kad pilno ilgio ML gali turėti signalinę seką, kuri atskeliama ir susidaro subrendęs ligandas. Proteolizė
25 tarp Arg₁₅₃-Arg₁₅₄ gali palengvinti hML išskyrimą.

Ekspresijos vektorius, turintis pilną mML koduojančią seką, buvo laikinai transfekuotas į 293 ląstelių liniją, kaip aprašyta Pavyzdyje 1. Šių ląstelių kondicionuota terpė stimuliuoja ³H-timidino įsijungimą į
30 Ba/F3 lątesles, ekspresuojančias arba pelės arba žmogaus *mpl*, bet neturi įtakos motininei (be *mpl*) ląstelių linijai. Tai rodo, jog klonuota pelės ML kDNR koduoja funkcionuojantį ligandą, kuris gali aktyvuoti ir pelės, ir žmogaus ML receptorių (*mpl*).

11. Kiaulės *mpl* ligandas

Kiaulės ML (pML) kDNR buvo išskirta RACE PCR būdu, kaip aprašyta Pvz. 13. PCR produktas, 1342 bp kDNR, buvo rastas inkstuose ir klonuotas. Buvo nustatyta kelių klonų seka ir rastas 332 amino rūgščių liekanų kiaulės *mpl* ligandas, pavadintas pML (arba pML₃₃₂), kurio nukleotidų ir išvestinė amino rūgščių seka yra parodyta Fig. 20 (SEQ ID Nr.: 18 ir 19).

Po to, buvo nustatyta antra forma, pavadinta pML2 (žr. Fig. 21 [SEQ ID Nr.: 21]), koduojanti baltymą su 4 amino rūgščių liekanų delecija (228 amino rūgščių liekanos). pML ir pML2 amino rūgščių sekų palyginimas parodė, kad pastaroji forma yra identiška, išskyrus tai, kad tetrapeptido QLPP, atitinkančio 111-114 liekanas trūksta (žr. Fig. 22 [SEQ ID Nr.: 18 ir 21]). Keturios amino rūgščių liekanų delecijos, esančios pelės ir kiaulės ML kDNR, yra toje pačioje išvestinių baltymų sekų vietoje.

Palyginus žmogaus, pelės ir kiaulės (Fig. 19 [SEQ ID Nr.: 6, 17 ir 18]) subrendusio ML išvestinės amino rūgščių liekanų sekas, pasirodo, jog tarp pelės ir žmogaus ML visos sekos identiškumas yra 72 %, 68 % - tarp pelės ir kiaulės ir 73 % - tarp kiaulės ir žmogaus ML. Homologija yra žymiai didesnė ML N-galo pusėje (EPO homologinis domenai). Šis domenai yra nuo 80 iki 84 % identiškai tarp bet kurių rūšių, tuo tarpu kai baltymo C-galas (karbohidratinis domenai) yra identiškai tik tai nuo 57 iki 67 %. Dviejų bazinių amino rūgščių liekanų motyvas, kuris gali būti proteazės skėlimo vieta, yra eritropoetino homologo domeno C-gale. Šis motyvas yra konservatyvus šioje pozicijoje trijose rūšyse (Fig. 19 [SEQ ID Nr.: 6, 17 ir 18]). Antros vietos, kur yra dvi bazinės amino rūgščių liekanos, žmogaus ML sekoje tarp 245 ir 246 nukleotidų, nėra pelės ir kiaulės ML sekose. Pelės ir kiaulės ML seka turi 4 cisteinus, visus konservatyvius žmogaus ML sekoje. Yra septynios potencia-

lios glikozilinio vietos pelės ligande ir šešios kiaušės ML, 5 iš kurių yra konservatyvios žmogaus ML sekoje. Vėl, visos potencialios N-glikozilinio vietos yra baltymo C-gale.

5

12. TPO ekspresija ir gryninimas iš Kinietišku žiurkėnių kiaušidžių (CHO) ląstelių

CHO ląstelių transfekcijai panaudoti vektoriai buvo pažymėti: pSVI5.ID.LL.MLORF (pilno ilgio arba TPO₃₃₂) ir pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (sutrumpintas arba TPO₁₅₃). Šių plazmidžių savybės yra pateiktos Fig. 23 ir
10 24.

Transfekcijos procesas yra aprašytas Pavyzdyje 20. Trumpai, kDNR, atitinkanti pilną TPO skaitymo rėmelį, buvo gauta PCR pagalba. PCR produktas buvo išgrynintas ir klonuotas į restrikcijos (ClaI ir SalI) sritį plazmidėje pSVI5.ID.LL, taip buvo gautas vektorius pSVI5.ID.LL.MLORF. Kitas konstruktas, atitinkantis EPO homologo domeną, buvo gautas tuo pačiu būdu, bet naudojant skirtingą atvirkštinį pradmenį (EPOD.Sal). Galutinis konstruktas, atitinkantis TPO baltymo EPO
15 homologinį domeną, buvo pavadintas pSVI5.ID.LL.MLEPO-D.
20

Šie konstruktai buvo linearizuojami su NotI ir transfekuoti elektroporacija į Kinietišku žiurkėnių kiaušidžių ląsteles (CHO-DP12 ląstelės, EP 307247, publikuotas 1989.03.15). 10⁷ ląstelių buvo elektroporuo-
25 jamos BRL elektroporacijos aparate (350 V, 330 mF, esant mažai talpuminei varžai), pridėjus 10, 25 arba 50 mg DNR, kaip aprašyta (Anderson, G. L. J. *Tissue Cult. Meth.*, 15,56 [1993]). Praėjus dienai po transfekcijos, ląstelės buvo perkeltos į DHFR selektyvią terpę
30 (DMEM-F12 su didele koncentracija gliukozės 50:50 be glicino, su 2 mM glutamino, 2 - 5 % dializuoto embrioninio galvijų serumo). Po 10 - 15 dienų atskiri klonai buvo perkeliami į 96 šulinėlių plokšteles arba paliekami augti iki monosluoksnio susidarymo. Šių klonų ML₁₅₃

arba ML₃₃₂ ekspresija kondicionuotoje terpėje buvo įvertinama Ba/F3-*mpl* proliferacijos analize (aprašyta Pavyzdyje 1).

5 TPO išskyrimas ir gryninimas iš CHO ląstelių auginimo terpės aprašytas Pavyzdyje 20. Trumpai, surinkta ląstelių auginimo terpė (HCCF) buvo sorbuojama Blue Sepharose kolonoje (Pharmacia) (100 l HCCF 1 litrui sorbento). Kolona po to buvo praplaunama nuo 3 iki 5 kolonos tūrių buferinio tirpalo, po to praplaunama nuo 10 3 iki 5 kolonos tūrių to paties buferinio tirpalo su 2,0 M karbamido. TPO baltymas buvo eliuuojamas 3 - 5 kolonos tūriais buferinio tirpalo su 2,0 M karbamido ir 1,0 M NaCl.

Surinktos po Blue Sepharose kolonos frakcijos, 15 kuriose buvo TPO, buvo sorbuotos ant Wheat Germ Lectin Sepharose kolonos (Pharmacia), nulygsvarintos Blue Sepharose kolonėlės eliucijos buferiniu tirpalu, parinkus tokį santykį: nuo 8 iki 16 ml eliuato 1 ml sorbento. TPO buvo eliuuojamas 2 - 5 kolonos tūriais buferinio 20 tirpalo su 2,0 M karbamido ir 0,5 M N-acetil-D-gliukozamino.

Eliuatas iš Wheat Germ Lectin, kuriame buvo TPO, buvo parūgštinamas ir pridedama C₁₂E₈ iki galutinės jo koncentracijos 0,04 %. Toks tirpalas buvo sorbuojamas ant atvirkščių fazių kolonėlės C4, nulygsvarintos 0,1 % 25 TFA, 0,04 % C₁₂E₈, sorbuojant nuo 0,2 iki 0,5 mg baltymo vienam ml sorbento.

Baltymas buvo eliuuojamas dvifaziu linijiniu acetonitrilo gradientu su 0,1 % TFA ir 0,04 % C₁₂E₈; 30 eliujuotos frakcijos buvo apjungiamos po SDS PAGE analizės.

Po C4 kolonėlės apjungtos frakcijos buvo praskiedžiamos ir diafiltruojamos prieš apytikriai 6 tūrius buferinio tirpalo Amicon YM aparatu arba naudojant 35 kitas panašias ultrafiltracines membranas, kurių pralaidumo riba yra molekulinės masės nuo 10 iki 30 kD.

Gautas diafiltratas gali būti tiesiogiai naudojamas arba toliau sukonzentruojamas ultrafiltruojant. Į diafiltratą/konzentratą buvo pridėdama Tween-80 iki galutinės jo koncentracijos 0,01 %.

- 5 Visas diafiltratas/konzentratas arba jo dalis, atitinkanti 2 - 5 % apskaičiuoto kolonos tūrio, buvo chromatografuojama Sephacryl S-300 HR kolonėlėje (Pharmacia), nulysvarintoje buferiniu tirpalu, kuriame buvo 0,01 % Tween-80. Frakcijos, kuriose buvo, SDS PAGE
- 10 analizės duomenimis, neagregavęs ir proteoliškai nede-gradavęs, TPO baltymas, buvo apjungiamos. Šios apjungtos frakcijos buvo perfiltruotos ir saugomos 2 - 8°C temperatūroje.

13. Transformavimo, TPO sintezės indukcijos mikroorganizmuose, išskyrimo, gryninimo ir TPO struktūros atstatymo būdai

- 15 *E.coli* TPO ekspresijos vektorių konstrukcija yra detaliai aprašyta Pvz. 21. Plazmidės pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 ir pMP202 buvo sukonstruotos ekspresuoti pirmąsias 155 TPO amino rūgštis po trumpos lyderinės sekos, kuri yra skirtinga skirtingose konstrukcijose.
- 20 Lyderinė seka pirmiausia reikalinga efektyviai transliacijos iniciacijai ir greitam išvalymui. Plazmidės pMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 yra sukurios ekspresuoti pirmąsias 153 TPO amino rūgštis po iniciacijos metionino ir skiriasi tiksliai kodonų panaudojime pirmoms
- 25 šešioms TPO amino rūgštims, nors pMP251 plazmidė yra sukonstruota iš pMP210-1 plazmidės, kur TPO C-galas yra prailgintas dviem amino rūgštimis. Visos aukščiau pateiktos plazmidės užtikrina didelį TPO viduląstelinės ekspresijos lygį *E.coli*, indukuojant triptofaninį pro-
- 30 motorių. (Yansura, D.G.et.al., *Methods in Enzymology* (Goeddel, D.V.Ed.)185:54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Plazmidės pMP1 ir pMP172 yra tarpinės, konst-

ruojant aukščiau aprašytas vidulastelinės ekspresijos plazmides.

Aukščiau aprašytos TPO ekspresijos plazmidės buvo naudotos *E.coli* transformacijoje, atliekant ją CaCl_2 5 temperatūrinio šoko metodu (Mandel, M. et.al. *J. Mol. Biol.*, 53:159-162, [1970]) ir kitas procedūras, aprašytas Pavyzdyje 21. Transformuotos ląstelės buvo auginamos pirmiausia 37°C , kol kultūros optinis tankis (600 nm) pasiekia apie 2-3. Kultūra buvo skiedžiama ir, 10 po auginimo aeruojant, buvo pridėta rūgštis. Tada kultūra vėl buvo auginama aeruojant dar 15 valandų, po to ląstelės buvo surenkamos centrifūguojant.

Pateiktos žemiau biologiškai aktyvaus, atstatytos struktūros žmogaus TPO ar jo fragmentų išskyrimo, gryninimo ir struktūros atstatymo procedūros yra aprašytos Pavyzdžiuose 22 ir 23 ir gali būti panaudotos bet kokio TPO varianto gavimui, įskaitant praplėstas N ir C galines formas. Kitos procedūros, tinkamos rekombinantinio ar sintetinio TPO struktūros atstatymui, gali būti randamos šiuose patentuose; Builder et al., JAV patentas 20 4511502 ; Jones et. al., JAV patentas 4512922; Olson JAV patentas 4518526 ir Builder et.al., JAV patentas 4620948; aprašančiuose įvairių rekombinantinių baltymų, ekspresuojamų *E.coli* netirpioje formoje, gavimo ir 25 struktūros atstatymo procesą.

A. Netirpaus TPO baltymo išskyrimas

Mikroorganizmas, toks kaip *E. coli*, ekspresuojantis TPO, koduojamą bet kokia tinkama plazmide, kultivuojamas sąlygomis, kai TPO produkuojamas netirpus 30 "intarpiniuose kūneliuose". Ląstelės iš pradžių praplaunamos ląstelių ardymo buferiniu tirpalu. Paprastai apie 100 g ląstelių suspenduojama 10 kartų didesniame, nei ląstelių tūris, ardymo buferiniame tirpale (pvz., 35 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) su, pavyzdžiui, Polytron

homogenizatoriumi, ir ląstelės nucentrifūguojamos esant 5000xg 30 min. Po to ląstelės ardamos, naudojant įprastą tam techniką: osmotinis šokas, apdorojimas ultragar-su, ciklinis slėgio sudarymas ar fermentiniais ir cheminiais būdais. Pavyzdžiui, praplautos, kaip aprašyta aukščiau, ląstelės gali būti suspenduojamos su homogenizatoriumi 10 tūriuose ląstelių ardymo buferiniame tirpale, ląstelių suspensija praleidžiama per LH Cell Disrupter (LH Inceltech, Inc) ląstelių ardymo aparatą ar per Microfluidizer (Microfluidics International) aparatą, pagal gamintojų pateikiamas rekomendacijas. Nuosėdos, kuriose yra TPO, atskiriamos nuo skysčio ir praplaunamos tam tinkamu tirpalu. Pavyzdžiui, ląstelių lizato suspensija centrifūguojama 5000xg 30 min., suspenduojama ir vėl centrifūguojama, taip gaunamos atplautų intarpinių kūnelių nuosėdos. Taip atplautos nuosėdos gali būti panaudotos nebedelsiant arba laikomos užšaldytos (pvz., -70°C).

20 *B. Monomerinio TPO tirpinimas ir gryninimas*

Netirpūs TPO intarpinai kūneliai soliubilizuojami buferiniame tirpale. Šio tirpalo sudėtyje yra chaotropinis agentas, paprastai šio tirpalo sudėtyje yra buferinis tirpalas, palaikantis šarminį pH, ir redukuojantis agentas padidinti monomerinio TPO išeigą. Chaotropiniai agentai gali būti karbamidas, guanidino HCl, natrio tiocianatas. Geriausias chaotropinis agentas yra guanidino HCl. Chaotropinio agento koncentracija paprastai gali būti nuo 4 iki 9 M, geriausia, kai 6 - 8 M. Tirpalo, naudojamo soliubilizavimui, pH palaikomas nuo 7,5 iki 9,5, geriau, kai pH yra 8,0-9,0 ir geriausia, kai pH 8,0. Geriau, kai buferiniame tirpale yra redukuojantis agentas, kuris padeda formuoti monomeriniam TPÖ. Tinkamas redukuojantis agentas yra organinė medžiaga, kurioje yra laisvos tiolinės grupės (RSH). Tokie redukuojantys agentai gali būti: ditiotreitolis

(DTT), ditioeritritolis (DTE), merkaptoetanolis, gliutationas (GSH), cisteaminas ir cisteinas. Geriausiai tinkamas redukuojantis agentas yra ditiotreitolis (DDT). Papildomai soliubilizacijos buferiniame tirpale
5 gali būti silpnas oksiduojantis agentas (pvz., molekulinis deguonis) ir sulfito druska, kad susidarytų sulfitolizės metu monomerinis TPO. Šiame aprašyme gauto TPO-S-sulfonato struktūra vėliau atstatoma redoks buferiniame tirpale (pvz., GSH/GSSG), ir susidaro taisyklingos struktūros TPO.
10

TPO baltymas toliau gryninamas, naudojant, pavyzdžiui, centrifūgavimą, gelfiltracinę chromatografiją ir atvirkščių fazių chromatografiją.

Iliustracijai pateikiamas pakankamos išeigos monomerinio TPO gryninimo pavyzdys. Intarpinių kūnelių nuosėdos suspenduojamos penkis kartus didesniame, nei nuosėdos, soliubilizacijos buferiniame tirpale (20 mM Tris, pH 8, su 6-8 M guanidino ir 25 mM DTT) ir maišoma 1-3 valandas ar per naktį 4°C temperatūroje; taip gautas ištirpęs TPO baltymas. Galima naudoti ir dideles karbamido koncentracijas (6-8 M), bet šiuo atveju gautos mažesnės išeigos, lyginant su guanidinu. Po soliubilizacijos tirpalas nuskaidrinamas centrifūguojant 30000xg 30 min., surenkamas supernatantas, kuriame yra
25 denatūruotas monomerinis TPO baltymas. Supernatantas chromatografuojamas (pratekėjimo greitis 2 ml/min.) Superdex 200 gelfiltracinėje kolonėlėje (Pharmacia, 2,6x60 cm), baltymai eliuuojami su 20 mM Na fosfatinu buferiniu tirpalu, pH 6,0, su 10 mM DTT. Surenkamos
30 frakcijos, tarp 160 ir 200 ml, kuriose yra monomerinis denatūruotas TPO baltymas. Toliau TPO baltymas chromatografuojamas pusiau preparatyvinėje C4 atvirkščių fazių kolonėlėje (2x20 cm, VYDAC). Baltymų tirpalas užnešamas 5 ml/min greičiu ant nulygsvarintos 0,1 % TFA
35 (trifluoracto rūgštimi) 30 % acetonitrile. Baltymai eliuojami linijiniu acetonitrilo gradientu (30-60 %

per 60 min.). Išgrynintas redukuotas baltymas eliuojamas, esant acetonitrilo koncentracijai ~50 %. Po to vykdomas taip išgryninto baltymo struktūros atstatymas ir gaunamas biologiškai aktyvus TPO baltymo variantas.

5

C. TPO baltymo struktūros atstatymas, gaunant biologiškai aktyvią formą.

Po soliubilizacijos ir gryninimo biologiškai aktyvi TPO baltymo forma gaunama atstatant denatūruoto monomerinio TPO baltymo struktūrą redoks buferiniame tirpale. Didelio biologinio aktyvumo (pusė maksimalios Ba/F3 ląstelių stimuliacijos analizėje koncentracijos pasiekama, esant koncentracijai iki ~3 pg/ml) TPO baltymą galima gauti, naudojant daug įvairių buferinių tirpalų, detergentų ir redoks sistemų. Bet daugeliu atvejų taisyklingos struktūros baltymo išeiga yra maža (<10 %). Gamybiniam procesui reikalinga, kad struktūros atstatymo išeiga būtų nemažesnė 10 %, geriau kad būtų 30-50 %, dar geriau - daugiau 50 %. Gali būti naudojama daugelis paviršiaus aktyvių medžiagų: Triton X-100, dodecil-β-maltozidas, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkozilas, Tween 20 ir Tween 80, Zwittergent 3-14 ir kiti. Naudojant šias paviršiaus aktyvias medžiagas, gaunamas bent mažas kiekis taisyklingai atstatytos struktūros TPO baltymo. Iš šių paviršiaus aktyvių medžiagų geriausios yra CHAPS grupės (CHAPS ir CHAPSO). Jos yra geriausios struktūros atstatymo procesui, kadangi naudojant jas išvengiama baltymų agregacijos ir netaisyklingų disulfidinių tiltelių susidarymo. Geriausia naudoti didesnes, nei 1 % CHAPS koncentracijas. Norint gauti didesnes proceso išeigas, reikalingas natrio chloridas, jo optimali koncentracija yra tarp 0,1 ir 0,5 M. EDTA (1-5 mM) reikalingas struktūros atstatymo buferiniame tirpale metalų jonais katalizuojamų oksidacijos procesu pašalinimui (ir baltymų agregacijos išvengimui), šie procesai stebimi kai kuriems preparatams. Didesnės, nei

15 % glicerino koncentracijos sudaro optimalias struktūros atstatymo sąlygas. Norint pasiekti didesnes proceso išeigas, labai svarbu, kad tirpale būtų ir oksiduotas ir redukuoti organiniai tioliniai junginiai (RSH). Tinkamos redoks poros yra: merkaptoetanolis, gliutationas (GSH), cisteamidas, cisteinas ir šiuos junginius atitinkačios oksiduotos formos. Geriausios redoks poros yra gliutationas (GSH) - oksiduotas gliutationas (GSSG) arba cisteinas - cistinas. Pati geriausia pora yra gliutationas (GSH) - oksiduotas gliutationas (GSSG). Paprastai gaunamos didesnės proceso išeigos, kai oksiduotos ir redukuotos formos molinis santykis yra lygus ar didesnis, nei vienetas. TPO preparatų struktūros atstatymui optimalus tirpalo pH yra nuo 7,5 iki ~9. Organinių tirpiklių (pvz., etanolio, acetonitrilo, metanolio) toleruojama koncentracija yra 10-15 %, arba mažesnė. Didinant organinių tirpiklių koncentraciją, didėja baltymo formų su netaisyklingais disulfidiniais tilteliais. Geriausia naudoti TRIS arba fosfatinius buferinius tirpalus. Struktūros atstatymo procesą atliekant 4°C temperatūroje, gaunama didesnė taisyklingos struktūros baltymo išeiga.

TPO preparatams, grynintiems per pirmąją C4 kolonėlę, struktūros atstatymo proceso tipiška išeiga yra 40-60 % (skaičiuojant nuo redukuoto ir denatūruoto TPO baltymo kiekio). Biologiškai aktyvūs preparatai gali būti gaunami, kai struktūros atstatymo procese naudojami mažiau išgryninti preparatai (pvz., po Superdex 200 gelfiltracijos ar po intarpinių kūnelių ekstrakcijos), nors šiais atvejais šio proceso išeiga būna mažesnė dėl didelio baltymo išsėdimo į nuosėdas ir dėl priemaišinių baltymų trukdymo.

Kadangi TPO baltymo sudėtyje yra keturios cisteino liekanos, tai galimi trys skirtingi disulfidinių tilte-

lių susidarymo variantai šiame baltyme:

- 1 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-4 ir 2-3
cisteino liekanos
- 2 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-2 ir 3-4
cisteino liekanos
- 3 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-3 ir 2-4
cisteino liekanos

Pradinių struktūros atstatymo sąlygų tyrimuose buvo naudojama keletas frakcijų TPO baltymo po chromatografijos atvirkštinių fazių kolonėlėje C4. Tik viena
5 frakcija pasižymėjo žymesniu biologiniu aktyvumu, tiriant su BA/F3 ląstelėmis. Vėliau struktūros atstatymo sąlygos buvo optimizuojamos. Šiomis sąlygomis neteisingos struktūros baltymo kiekis buvo mažesnis, nei 10-20 % nuo bendro gauto monomerinio TPO kiekio.

10 Biologiškai aktyvaus TPO baltymo disulfidinių tiltelių vietos yra tarp 1-4 ir 2-3 cisteino liekanos (liekanų numeravimas pateiktas pradedant nuo baltymo N galo), tai buvo nustatyta remiantis biologiniu aktyvumu, masspektroskopija ir analizuojant baltymo amino
15 rūgščių liekanų seką baltymo N gale. Tai sutampa su žinomomis disulfidinių jungčių vietomis eritropoetino molekulėje.

D. Rekombinantinio atstatytos struktūros TPO

20 *biologinis aktyvumas*

Atstatytos struktūros išgrynintas TPO pasižymėjo aktyvumu kaip *in vitro*, taip ir *in vivo* tyrimuose. Pavyzdžiui, tiriant BA/F3 ląstelėse buvo nustatyta, kad pusė maksimalios timidino įsijungimo į BA/F3 ląsteles
25 stimuliacijos buvo pasiekama su 3,3 pg/ml (0,3 pM) TPO (Met⁻¹ 1-153). Mėginius tiriant ELISA, pagrįsta sąveika su *mpl* receptoriumi, pusė maksimalaus aktyvumo pasiekama esant 1,9 ng/ml (120 pM) TPO koncentracijai. Normaliuose ir mielosupresuotuose gyvūnuose, apšvitintuose beveik letalia Rentgeno spindulių doze, TPO (Met⁻¹
30

1-153) labai efektyviai stimuliuo naujų trombocitų susidarymą (aktyvumas buvo pastebimas net esant dozei - 30 ng/pelei). Panašūs biologiniai aktyvumai buvo nustatyti ir kitiems, atstatytos struktūros pagal aprašytas procedūras (žiūr. Fig. 25, 26 ir 28), TPO variantams.

14. Trombopoetino aktyvumo matavimo metodai

Trombopoetinis aktyvumas gali būti išmatuotas įvairiais metodais, tarp jų: Ba/F3 *mpl* ligando metodu, aprašytu Pavyzdyje 1, *in vivo* pelių atsakomosios trombocitozės metodu, trombocitų paviršiaus antigeno indukcijos metodu, kuriame šis antigenas imunologinės analizės būdu (anti-GPII_bIII_a) matuojamas žmogaus leukemijos megakarioblastinės linijos (CMK) ląstelių paviršiuje (žiūr. Sato et al., *Brit. J. Haematol.*, 72:184-190 [1989]) (taip pat žiūr. suspensinės megakariopoezės metodą, aprašytą Pavyzdyje 4) ir poliploidizacijos indukcijos metodu, naudojant megakarioblastų ląstelių liniją (DAMI) (žiūr. Ogura et al., *Blood*, 72(1):49-60 [1988]). Megakariocitų brendimas iš nesubrendusių ląstelių, kurių dauguma nesintetina DNR, į morfologiškai identifikuojamus megakariocitus yra procesas, apimantis citoplazminių organelių ir membraninių antigenų (GPII_bIII_a) atsiradimą, endoreplikaciją ir trombocitų formavimąsi, kaip aprašyta išradimo pagrindime. Faktorius, specifiskai skatinantis megakariocitų atšakos ląstelių brendimą (pvz., *mpl* ligandas), turėtų sukelti nesubrendusiuose megakariocituose bent keletą iš paminėtų pasikeitimų, kurių pasekmė yra trombocitų formavimasis ir trombocitopenijos palengvėjimas. Tokiu būdu, buvo paruošti metodai, įgalinantys matuoti šių parametų pasirodymą nesubrendusių megakariocitų ląstelių linijose, pvz., CMK ir DAMI ląstelėse. CMK analizės metodas (Pavyzdys 4) nustato specifinio trombocitų markerio GPII_bIII_a atsiradimą ir trombocitų atskilimą. DAMI analizės metodas (Pavyzdys 15) matuoja endorepli-

kacija, kadangi padidėjęs ploidiškumas yra būdingas subrendusių megakariocitų bruožas. Atpažįstamų megakariocitų ploidiškumo skaičiai yra 2N, 4N, 8N, 16N, 32N *etc.* *In vivo* pelių atsakomosios trombocitozės metodu
 5 (Pavyzdys 16) galima parodyti, kad testuojamojo junginio (čia *mpl* ligando) vartojimas sukelia trombocitų skaičiaus padidėjimą.

TPO aktyvumui matuoti buvo paruošti dar du *in vitro* metodai. Pirmasis metodas yra kinazės receptoriaus aktyvacijos (KIRA) ELISA. Šiame metode CHO ląstelės transfekuojamos *mpl*-Rse chimera ir ELISA pagalba matuojamas Rse tirozino liekanų fosforilinimas po *mpl* ligando sąveikos su chimerinės molekulės *mpl* dalimi (žiūr. Pavyzdį 17). Antrasis metodas yra ELISA, pagrįsta *mpl* ligando sąveika su receptoriumi. ELISA plokštelėje imobilizuoti triušio antikūnai prieš žmogaus IgG sąveikauja su žmogaus chimeriniu receptoriumi *mpl*-IgG, kuris savo ruožtu prijungia *mpl* ligandą, esantį analizuojamame mėginyje. Prisijungusiam *mpl* ligandui
 15 nustatyti naudojami triušio polikloniniai antikūnai prieš *mpl* ligandą (TPO₁₅₅), žymėti biotinu ir streptavidin-peroksidazė, kaip aprašyta Pavyzdyje 18.

15. Normalių ir subletalai apšvitintų pelių *in vivo* biologinis atsakas į gydymą TPO

Normalioms ir subletalai apšvitintoms pelėms buvo
 25 leidžiamas sutrumpintas ir pilno ilgio TPO, išskirtas iš kinietišų žiurkėnių kiaušidžių ląstelių (CHO), *E. coli* ir žmogaus embrioninių inkstų ląstelių (293). Abi TPO formos, produkuotos visuose trijose šeimininkuose, stimuliuoja trombocitų produkciją pelėse, tačiau geriausią *in vitro* atsaką sukelia pilno ilgio TPO, išskirtas iš CHO ląstelių. Šie rezultatai rodo, kad teisingas C galo domeno glikozilinimas gali būti svarbus veiksnys, siekiant optimalaus aktyvumo *in vivo*.
 30

(a) *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153)

EPO domeno "Met" forma (Met⁻¹ padėtyje ir pirmosios 153 žmogaus TPO amino rūgščių liekanos), produkuojama *E. coli* (žiūr. Pavyzdį 23), buvo leidžiama kasdien
5 normalioms C57 B6 pelių patelėms, kaip pateikta Fig. 25A, 25B ir 25C aprašymuose. Šie piešinėliai rodo, kad neglikozilinta sutrumpinta TPO forma, pagaminta *E. coli* ir turinti atstatytą, kaip aprašyta aukščiau, baltymo struktūrą, stimuliuoja trombocitų produkciją normaliose
10 pelėse apie du kartus ir neturi įtakos raudonųjų bei baltųjų kraujo ląstelių populiacijoms.

Ta pati TPO forma, kasdien leista subletaliai apšvitintoms (¹³⁷Cs) C57 B6 pelių linijos patelėms, kaip pateikta Fig. 26A, 26B ir 26C aprašymuose, stimuliuoja
15 trombocitų kiekio atstatymą ir sumažindavo kritinį lygį, bet neturėjo jokio efekto eritrocitų ir leukocitų populiacijoms.

(b) CHO-rhTPO₃₃₂

Pilno ilgio TPO forma, pagaminta CHO ląstelėse ir
20 leista normalioms C57 B6 pelių linijos patelėms, kaip pateikta Fig. 27A, 27B ir 27C aprašymuose, sukėlė normaliose pelėse trombocitų produkcijos padidėjimą penkis kartus, neveikiant eritrocitų ir leukocitų populiacijas.

(c) CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153); 293-rhTPO₃₃₂
25 ir *E. coli*-rhTPO₁₅₅

Buvo sudarytos priklausomybės nuo dozės kreivės, leidžiant normalioms pelėms rhTPO, pagamintą skirtin-
gose CHO ląstelių linijose (CHO-rhTPO₃₃₂; *E. coli*-rhTPO_(Met⁻¹,153); 293-rhTPO₃₃₂ ir *E. coli*-rhTPO₁₅₅), kaip
30 pateikta Fig. 28 aprašyme. Šis piešinėlis rodo, kad visos analizuotos molekulių formos stimuliuoja trombocitų produkciją, tačiau pilno ilgio forma, pagaminta CHO ląstelėse, turėjo didžiausią aktyvumą *in vivo*.

(d) CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"sutrumpintas"} ir CHO-rhTPO₃₃₂

Priklausomybės nuo dozės kreivės buvo taip pat sudarytos, leidžiant normalioms pelėms įvairias rhTPO formas, pagamintas CHO ląstelėse (CHO-rhTPO₁₅₃, CHO-rhTPO_{"sutrumpintas"} ir CHO-rhTPO₃₃₂), kaip pateikta Fig. 29 aprašyme. Šis piešinėlis rodo, kad visos analizuotos molekulės formos stimuluoja trombocitų produkciją, bet pilno ilgio 70 kD forma pasižymi didžiausiu aktyvumu *in vivo*.

10

16. *mpl* ligando ir jo variantų rekombinantinės gamybos pagrindai

Geriausia, kai *mpl* ligandas yra gaminamas standartinėmis rekombinantinėmis procedūromis, kurios apima *mpl* ligando polipeptido produkciją, kultivuojant ląsteles, transfekuotas taip, kad galėtų ekspresuoti *mpl* ligandą, koduojamą nukleino rūgštimi (paprastai ląstelės transformuojamos ekspresijos vektoriumi), ir polipeptido išskyrimą iš ląstelių. Tačiau, galima įsivaizduoti kitus *mpl* ligando gamybos būdus, naudojant homologinės rekombinacijos metodą arba įterpiant kontroliuojančius elementus į ląsteles, turinčias *mpl* ligandą koduojančią DNR. Pavyzdžiui, stiprus promotorius/sustiprintojas arba supresorius, arba egzogeninis transkripciją moduliuojantis elementas gali būti įterpti į norimos ląstelės-šeimininkės genomą tokia atstume nuo DNR, koduojančios *mpl* ligando polipeptidą, sekos ir tokioje orientacijoje, kad galėtų įtakoti šios DNR transkripciją. Kontroliuojantis elementas nekoduoja *mpl* ligando; šį polipeptidą koduoja DNR, priklausanti ląstelei-šeimininkei. Toliau ląstelės tikrinamos, siekiant atrinkti, priklausomai nuo tikslo, ląsteles, gaminančias receptorinį polipeptidą, aprašomą šiame išradime, arba ląsteles, kuriose ekspresijos lygis yra padidintas arba sumažintas.

30

Taigi, šiame išradime pateikiamas *mpl* ligando gamybos būdas, kuriame: į ląstelių, turinčių *mpl* ligandą koduojančią nukleino rūgšties molekulę, genomą, įterpia transkripciją moduliuojantį elementą, tokiu atstumu ir
5 tokioje orientacijoje, kad galėtų įtakoti transkripciją; toliau ląsteles, turinčias transkripcijos moduliuojantį elementą ir nukleino rūgšties molekulę, kultivuoja. Išradime taip pat aprašoma ląstelė-šeimininkė, turinti endogeninę, *mpl* ligandą koduojančią nukleino
10 rūgšties molekulę, funkcionaliai sujungtą su egzogeninėmis reguliuojančiomis sekomis, kurias gali atpažinti ląstelė-šeimininkė.

A. mpl ligando polipeptidą koduojančios DNR

15 *išskyrimas*

DNR, koduojančią *mpl* ligando polipeptidą, galima išskirti iš bet kurios kDNR bibliotekos, paruoštos iš audinių, kuriuose, kaip tikimasi, vyksta pakankama *mpl* ligando iRNR ekspresija. *mpl* ligando geną galima iš-
20 skirti iš genominės DNR bibliotekos, o taip pat sintetinant *in vitro* oligonukleotidų seką, pagal pilną nukleotidų ar amino rūgščių liekanų seką.

Bibliotekos tikrinamos naudojant pavyzdžius, sugerbančius identifikuoti norimą geną ar to geno koduojamą
25 baltymą. Tikrinant kDNR ekspresijos bibliotekas, tinkami pavyzdžiai yra monokloniniai ar polikloniniai antikūnai, kurie atpažįsta ir specifiškai sąveikauja su *mpl* ligandu. Tikrinant kDNR bibliotekas, tinkami pavyzdžiai yra 20-80 bazių ilgio oligonukleotidai, koduojan-
30 tys žinomas ar spėjamas *mpl* ligando kDNR dalis, priklausančias tai pačiai ar skirtingoms rūšims; ir/arba komplementarios arba homologinės kDNR arba jų fragmentai, koduojantys tą patį arba panašų geną. Tinkami pavyzdžiai genominės DNR bibliotekos tikrinimui apima,
35 bet tuo neapsiriboja: oligonukleotidus, kDNR ar jų fragmentus, kurie koduoja tą patį ar panašų geną,

ir/arba homologines genomines DNR ar jų fragmentus. kDNR ar genominės bibliotekos tikrinamos, naudojant pasirinktą pavyzdį pagal standartines procedūras, aprašytas Sambrook et al., *supra*, skyriuose 10-12.

5 Kitas būdas išskirti *mpl* ligandą koduojantį geną yra PCR metodas, aprašytas Sambrook et al., *supra*, skyriuje 14. Šis metodas reikalauja, kad būtų naudojami oligonukleotidiniais pavyzdžiais, kurie hibridizuojasi su DNR, koduojančia *mpl* ligandą. Oligonukleotidų pasirinkimo strategijos aprašytos žemiau.

10 Geriausias šio išradimo įgyvendinimo būdas yra panaudoti kruopščiai pasirinktas oligonukleotidines sekas kDNR bibliotekų, pagamintų iš įvairių audinių, geriau žmogaus ar kiaulės inkstų (embrionų ar suaugusių) ar kepenų ląstelių, tikrinimui. Pavyzdžiui, žmogaus embriono kepenų ląstelių linijos kDNR bibliotekos tikrinamos, naudojant oligonukleotidinį pavyzdį. Taip pat ir žmogaus genominės bibliotekos gali būti tikrinamos oligonukleotidiniu pavyzdžiu.

20 Oligonukleotidų sekos, pasirinktos kaip pavyzdžiai, turi būti pakankamo ilgio ir pakankamai specifinės, siekiant sumažinti iki minimumo tariamai teigiamų signalų atsiradimą. Paprastai nukleotidinė seka (sekos) yra parenkamos iš tokių *mpl* ligandą koduojančios sekos regionų, kur kodonų įvairovė yra mažiausia. Oligonukleotidai gali skirtis nuo pradinės sekos vienoje ar keliose pozicijose. Naudoti išsigimusius oligonukleotidus yra labai svarbu, kai tikrinamos kitų rūšių bibliotekos, kur kodonų naudojimas nežinomas.

30 Oligonukleotidai turi būti pažymimi, kad būtų galima po DNR hibridizacijos, tikrinant bibliotekas, juos detektuoti. Geriausias žymėjimo būdas yra panaudoti ATP (pvz., $\gamma^{32}\text{P}$) ir polinukleotidkinazę oligonukleotido 5' galo žymėjimui. Tačiau oligonukleotidų

žymėjimui galima naudoti ir kitus metodus, tarp jų ir žymėjimą biotinu ar fermentu ir kitus.

Svarbiausia *mpl* ligandą koduojanti nukleino rūgštis yra ta, kuri koduoja pilno ilgio *mpl* ligando polipeptidą. Keliuose šio išradimo palankiausiuose variantuose naudojama nukleino rūgšties seka, apimanti ir natyvaus *mpl* ligando signalinę seką. Nukleino rūgštis, turinti visą baltymą koduojančią seką, yra gaunama tikrinant pasirinktą kDNR genomine biblioteka, naudojant išvestines amino rūgščių liekanų sekas.

B. Natyvaus mpl ligando amino rūgščių liekanų sekų variantai

mpl ligando variantai su skirtingomis amino rūgščių liekanų sekomis buvo gaunami, įterpiant reikalingus nukleotidus į *mpl* ligandą koduojančią DNR arba sintetinant *in vitro* norimą *mpl* ligando polipeptidą. Tokie variantai, pavyzdžiui, yra formos su delecijomis ar intarpais kiaulės *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekoje. Pavyzdžiui, N gale subrendusio viso ilgio *mpl* ligando dalis yra pašalinama proteolize, kaip *in vivo*, taip ir *in vitro* arba klonuojant ir ekspresuojant fragmentą DNR, koduojančios viso ilgio *mpl* ligandą, siekiant gauti biologiškai aktyvų variantą. Bet kokios delecijų, intarpų ar pakeitimų kombinacijos yra padaromos tam, kad būtų galima gauti galutinę konstrukciją, kuri pasižymėtų norimu biologiniu aktyvumu. Amino rūgščių liekanų pakeitimai gali būti padaromi *mpl* ligando postransliacijos procese, kaip antai, pakeičiant glikozilinimo skaičių ir vietą. Konstruojant *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekos variantus, taškinės mutacijos vieta ir mutacijos pobūdis priklauso nuo norimų pakeisti *mpl* ligando charakteristikų (charakteristikos). Taškinės mutacijos gali būti daromos atskirai arba kelios kartu, pavyzdžiui, (1) pirmiausia pa-

keičiant konservatyvia amino rūgščių liekana, o po to padaromas radikalesnis pakeitimas, kuris priklauso nuo pasirinkto tikslo, (2) pašalinant proteinazės skėlimo vietą ar (3) įterpiant panašias amino rūgščių liekanas
5 ar skirtingas intarpo kaimyninėms liekanoms arba atliekant 1-3 punkto kombinacijas.

Metodas identifikuoti tam tikrų *mpl* ligando polipeptido amino rūgščių liekanų ar jų regionų geriausioms mutagenezės vietoms yra vadinamas "alanino skanavimo
10 mutageneze", aprašyta Cunningham ir Wells, *Science*, **244**:1081-1085 [1989]. Šiame metode taikinio amino rūgščių liekana ar jų grupė yra identifikuojama (t.y., amino rūgščių liekana, kuri turi krūvį: Arg, Asp, His, Lys ir Glu) ir pakeičiama bet kokia, bet geriau neturinčia krūvio arba turinčia neigiamą krūvį amino rūgščių liekana (geriausiai alaninu ar polialaninu), siekiant pakeisti sąveiką tarp amino rūgščių liekanų ir vandens molekulių, esančių aplink baltymą, ląstelės viduje ar ląstelės išorėje. Domenai, kurie pasižymi
15 funkcionalių jautrumu pakeitimams, yra tobulinami, įterpiant papildomus ar kitus variantus prie pakeitimo vietos arba pakeitimo vietoje. Taigi, kai amino rūgščių liekanų variantų intarpų vieta nustatyta, mutacijos pobūdis iš esmės gali būti neapibrėžtas. Pavyzdžiui, siekiant optimizuoti mutaciją pasirinktoje vietoje, alanino skanavimas ar atsitiktinė mutagenezė vykdoma pasirinktame kodone ar regione ir atliekamas ekspre-
20 suotų *mpl* ligando variantų tikrinimas, atrenkant optimalias kombinacijas su norimu aktyvumu.

30 Yra du pagrindiniai kintamieji, konstruojant amino rūgščių liekanų sekų variantus: mutacijos vieta sekoje ir mutacijos prigimtis. Pavyzdžiui, *mpl* ligando polipeptido variantai apima amino rūgščių liekanų sekos *mpl* ligando variantus, kurie gali būti gamtinio *mpl* ligando aleliniai variantai (jiems nereikalingi pakeitimai DNR, koduojančiai *mpl* ligandą) arba mutantinės formos, pada-
35

rytos mutuoiant DNR. Šie variantai gali būti aleliniais ar variantais, kurie neaptinkami gamtoje. Paprastai mutagenizės vieta ir pobūdis priklauso nuo *mpl* ligando norimų modifikuoti charakteristikų.

5 Amino rūgščių liekanų sekoje delecijos paprastai atliekamos nuo 1 iki 30 liekanos, geriausia, kai jos atliekamos nuo 1 iki 10 amino rūgščių liekanos, ir paprastai atliekamos šalia esančių liekanų delecijos. Be to, amino rūgščių liekanų sekos delecijos *mpl* ligan-

10 de gali būti dalis ar visas glikoproteino C galo domenas. Amino rūgščių liekanų sekos delecijos gali apimti vieną ar kelias pirmųjų 6 amino rūgščių liekanas iš subrendusio baltymo C galo. Amino rūgščių liekanų delecijos gali apimti vieną ar kelias amino rūgščių

15 liekanas, esančias viename ar keliuose kilpos regione, kuris yra tarp "spiralinių klosčių". Gretimos delecijos paprastai daromos su lyginiu amino rūgščių liekanų skaičiumi, bet, priklausomai nuo tikslo, galimos ir vienos ar nelyginio skaičiaus amino rūgščių liekanų

20 skaičiaus delecijos. Delecijos gali būti padaromos tose mažai homologiškų *mpl* ligandų vietose, kurios pasižymi didžiausiu sekos identiškumu, tokiu būdu modifikuojant žmogaus *mpl* ligando aktyvumą. Labiau tikėtina, kad delecijos žinduolių *mpl* ligando polipeptide, padarytos

25 tose srityse, kurios yra homologiškos kitoms žinduolių *mpl* ligandų sekoms, žymiau pakeis *mpl* ligando biologinį aktyvumą. Nuoseklių delecijų skaičius gali būti pasirenkamas taip, kad nebūtų suardyta *mpl* ligando baltymo tretinė struktūra, pvz., β -klostė ar α -spiralės.

30 Amino rūgščių liekanų intarpai, įskaitant prijungimą prie N ir/arba C baltymo galo, gali būti nuo vienos amino rūgščių liekanos iki kelių šimtų amino rūgščių liekanų. Intarpų dydis sekos viduje (t.y., intarpai subrendusio *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekoje);

35 gali būti apie 1 - 10 amino rūgščių liekanų, geriau,

kai 1-5, geriausiai - nuo 1 iki 3 liekanų. Geriausias pavyzdinis *mpl* ligando ar jo fragmento suliejimas yra su kitu citokinu ar jo fragmentu. Intarpų prie N baltymo galo pavyzdžiai apima subrendusį *mpl* ligandą su N gale esančia metionino liekana, tiesioginės subrendusio *mpl* ligando ekspresijos rekombinantinėse kultūrose artefaktus, baltymus, kai prie subrendusio *mpl* ligando N galo prijungiamos baltymo N gale esančios heterologinės signalinės sekos, kurios įgalina rekombinantinius producentus sekretuoti subrendusį *mpl* ligandą. Šios signalinės sekos gali būti gaunamos iš ląstelių-šeimininkų, taigi, naudojamos signalinės sekos yra homologiškos ląstelės-šeimininko sekoms. Tinkamos signalinės sekos yra STII ar lpp iš *E. coli*, alfa faktorius iš mielių ir virusiniai signalai, tokie kaip žinduolių ląstelių herpes gD.

Kiti intarpų variantai, kai prie *mpl* ligando N arba C galo prijungiami imunogeniški polipeptidai (t.y., svetimi ląstelei-šeimininkui) yra šie: bakteriniai polipeptidai, tokie kaip beta-laktamazė arba fermentas, koduojamas *E. coli* trp lokuse, ar mielių baltymai; suliejant su *mpl* ligando C galu baltymus, turinčius ilgą gyvavimo pusperiodį, tokius kaip imunoglobulinų pastovūs regionai (arba kiti imunoglobulinų regionai), albuminas ar feritinas, kaip aprašyta patente WO 89/02922, publikuotame 1989.04.06.

Trečia variantų grupė yra amino rūgščių liekanų pakeitimo variantai. Šiuose variantuose bent viena amino rūgščių liekanų *mpl* ligando molekulėje yra pakeičiama skirtinga amino rūgščių liekana. Įdomiausios mutagenezės vietos yra *mpl* ligando aktyvusis centras (centrai) ir vietos, kur amino rūgščių liekanos, kurios aptinkamos ir kituose analoguose, yra labai skirtingos pagal šoninės grandinės tūrį, krūvį ar hidrofobiškumą, bet tose srityse yra didelė homologija tarp įvairių *mpl*

ligandų ir/arba tarp įvairių gyvūnų rūšių *mpl* ligandų analogų.

Kitos įdomios vietos yra tos, kuriose randamos identiškos tam tikros ypatingos *mpl* ligando amino rūgščių liekanos įvairiuose *mpl* ligando šeimos atstovuose ir/arba viename ligande įvairiose gyvūnų rūšyse. Šios vietos, ypatingai tos, kurios pakliūva mažiausiai į trijų kitų identiškų konservatyvių vietų sekas, yra pakeičiamos santykinai konservatyviomis amino rūgščių liekanomis. Tokie konservatyvūs pakeitimai yra pateikti Lentelėje 3. Jei šie pakeitimai turi įtakos biologiniam aktyvumui, tai padaromi dar žymesni pakeitimai, pavadinti pavyzdiniais pakeitimais Lentelėje 3, arba padaromi pakeitimai, aprašyti žemiau, nurodant amino rūgščių klases, ir gauti produktai patikrinami.

LENTELĖ 3

Pradinė amino rūgšties liekana	Pavyzdiniai pakeitimai	Geriausi pakeitimai
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucinas	Leu
Leu (L)	norleucinas; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucinas	Leu

Žymios *mpl* ligando funkcijos ar imunogeniškumo modifikacijos atliekamos, atrenkant pakeitimus, kurie turi didžiausią įtaką (a) polipetido grandinės struk-

tūrai pakeitimo vietoje, pavyzdžiui, β -klosčių ar α -spiralinių konformacijai, (b) krūviui ar hidrofobiškumui pakeitimo vietoje ar (c) šoninės grandinės užimamam tūriui. Gamtinės amino rūgščių liekanos yra suskirstomos į grupes pagal bendras šoninių radikalų savybes:

- (1) hidrofobinės: norleucinas, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutralios hidrofilinės: Cys, Ser, Thr;
- (3) rūgštinės: Asp, Glu;
- (4) bazinės: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) liekanos, turinčios įtakos grandinės orientacijai: Gly, Pro; ir
- (6) aromatinės: Trp, Tyr, Phe.

Atlikus pakeitimą nekonservatyvoje sekos vietoje, gali prireikti pakeisti vienos klasės narį kitos klasės nariu. Tokios pakeistos liekanos gali būti įterptos konservatyviose sekos pakeitimo vietose arba, dar geriau, nekonservatyviose vietose.

Viename išradimo variante siekiama inaktyvuoti vieną ar kelias proteinazių skėlimo vietas, esančias molekulėje. Šios vietos nustatomos, peržiūrint baltymo amino rūgščių liekanų seką, pvz., nustatant tripsino skėlimo vietas, ieškoma arginino ar lizino liekanų. Kai proteinazių skėlimo vietos yra nustatomos, jos padaromos neįautriomis proteolitiniui skėlimui, pakeičiant atitinkamą amino rūgščių liekaną į kitą, geriausiai į bazinę, pvz., glutaminą arba į hidrofobinę, pvz., seriną; taip amino rūgščių liekana gali būti pašalinta iš sekos arba greta skėlimo vietos gali būti įterpiama prolino liekana.

Kitame išradimo variante visos metionino liekanos, išskyrus pirmąją metionino liekaną signalinėje sekoje, arba bet kuri iš trijų amino rūgščių liekanų, esančių prieš arba po tokios metionino liekanos, pakeičiamos į kitas liekanas (pagal Lentelę 3) arba pašali-

namos. Taip pat į tokias vietas gali būti įterpiama 1 - 3 papildomos amino rūgščių liekanos.

Bet kokia cisteino liekana, kuri neturi įtakos taisyklingai *mpl* ligando konformacijai, gali būti pakeičiama, dažniausiai serinu, tam, kad būtų pagerintas molekulės atsparumas oksidacijai ir taip pat išvengta netaisyklingų disulfidinių tiltelių susidarymo. Buvo nustatyta, kad 1 ir 4 EPO domeno cisteino liekanos, skaičiuojant nuo N baltymo galo, būtinos taisyklingos konformacijos susidarymui, o 2 ir 3 - šiam procesui neturi įtakos. Taigi 2 ir 3 EPO domeno cisteino liekanos gali būti pakeistos.

Nukleino rūgščių molekulės, koduojančios *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekos variantus, gali būti pagamintos įvairiais žinomais metodais. Šie metodai apima, bet tuo neapsiriboja, nukleino rūgšties išskyrimą iš gamtinių šaltinių (natūralių amino rūgščių liekanų sekos varianto atvejais) arba nukleotidų sąlygojamos (arba kryptingos) mutagenezės, PCR mutagenezės ir kasečių mutagenezės būdais gautus mutantinius variantus, paruoštus iš anksčiau pagamintų variantinių arba laukinio tipo *mpl* ligando polipeptidų.

Oligonukleotidų sąlygojama mutagenėzė yra geriausias būdas gauti *mpl* ligando DNR variantus su amino rūgščių liekanų pakeitimais, delecijomis ar intarpais. Šis metodas plačiai žinomas ir aprašytas (Adelman et al., DNR, 2:183 [1983]. Reiziumuojant, *mpl* ligando DNR pakeičiama, hibridinant oligonukleotidus, koduojančius norimą mutaciją, su matrica, kuri yra plazmidės arba bakteriofago, turinčio nepakeistą ar natyvią *mpl* ligando DNR seką, viengrandė forma. Po hibridizacijos DNR polimerazės pagalba sintetinama visa antroji komplementari grandinė, kurioje yra ir oligonukleotinis pradmuo, koduojantis norimus *mpl* ligando DNR pakeitimus.

Paprastai naudojami ne trumpesni nei 25 bazių ilgio oligonukleotidai. Optimaliame nukleotide abiejuose

galuose turi būti 12 - 15 nukleotidų, visiškai komplementarių matricai, o mutaciją koduojantys nukleotidai lieka sekos vidury. Tai užtikrina teisingą oligonukleotido hibridizaciją su viengrande DNR matrica. Oligonukleotidai sintetinami žinomais būdais, kurie aprašyti Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:5765 [1978].

DNR matricos gali būti pagamintos iš vektorių, sukonstruotų bakteriofago M13 pagrindu, (tinkami komerciniai vektoriai yra M13mp18, M13mp19) arba tokių vektorių, kurie turi viengrandžio fago replikacijos iniciacijos vietą, kaip aprašyta Viera et al., *Meth. Enzymol.*, **153**:3 [1987]. DNR, kurioje norima padaryti mutaciją, įterpiama į vieną tokį vektorių ir tokiu būdu pagaminama viengrandė matrica. Viengrandžių matricų paruošimas aprašytas Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989) skyriai 4.21 -4.41.

Kitas būdas pagaminti viengrandę DNR matricą yra dvigrandės plazmidės ar kitos dvigrandės DNR denaturacija standartiniais metodais.

Siekiant pakeisti natyvią DNR seką (pvz., tam, kad pagaminti amino rūgščių liekanų sekos variantus), oligonukleotidas hibridinamas su viengrande matrica, esant tinkamoms hibridizacijos sąlygoms. Po to pridamas DNR polimerizaciją katalizuojantis fermentas, paprastai DNR polimerazė I, Klenow fragmentas, siekiant susintetinti matricai komplementarią grandinę, naudojant oligonukleotidą, kaip pradmenį. Tokiu būdu susidaro heterodupleksas, kuriame viena grandinė koduoja mutantinę *mpl* ligando formą, o kita (matrica) koduoja natyvią nepažeistą *mpl* ligando seką. Šis heterodupleksas toliau transformuojamas į tinkamą šeimininką, dažniausiai į prokariotinę ląstelę, pvz., *E coli* JM101. Kai ląstelės paauga, jos išsėjamos į Petri lėkštes su agarizuota terpe ir išaugusios kolonijos tikrinamos, naudojant ³²P

žymėtą oligonukleotidinių pradmenį, siekiant identifi-
kuoti bakterijų kolonijas, turinčias mutuotą DNR.
Mutuota sritis toliau išskiriama ir įterpiama į vek-
torių, tinkamą baltymo produkcijai, paprastai tai būna
5 ekspresijos vektorius, dažniausiai naudojamas pasi-
rinkto šeimininko transformacijai.

Aukščiau aprašytas metodas gali būti modifikuo-
jamas taip, kad susidarytų homodupleksinė molekulė,
kurioje abi grandinės turi mutaciją (mutacijas). Šios
10 metodo modifikacijos tokios: Viengrandis oligonukleo-
tidas hibridinamas su viengrande matrica, kaip aprašyta
aukščiau. Į trijų dezoksiribonukleotidtrifosfatų:
dezoksiriboadenozintrifosfato (dATP), dezoksiriboguan-
ozintrifosfato (dGTP) ir dezoksiribotimidintrifosfato
15 (dTTP) mišinį įdedamas modifikuotas tiodezoksiribocito-
zintrifosfatas (dCTP-[aS]) (Amersham Corporation). Šis
mišinys pridedamas prie matricos ir oligonukleotido
komplekso. Įdėjus į tokį mišinį DNR polimerazę, sinte-
tinama antroji DNR grandinė, komplementari matricai,
20 išskyrus mutuotus nukleotidus. Be to naujai susintetin-
toje grandinėje vietoj dCTP bus dCTP-(aS), kuris apsau-
go nuo skėlimo restrikcijos endonukleazėmis.

Po to matrica, esanti dvigrandžio heteroduplekso
sudėtyje, skeliama tinkamu restrikcijos fermentu ir
25 matricos dalis, atitinkanti norimos mutacijos vietą,
yra suskaldoma ExoIII nukleaze arba kita tinkama
nukleaze. Reakcija sustabdoma ir tokiu būdu susidaro
dalina viengrandė molekulė. Toliau, pridėjus DNR
polimerazę, visus keturis dezoksiribonukleotidtri-
30 fosfatus, ATP ir DNR ligazę, formuojamas dvigrandis DNR
homodupleksas. Šis homodupleksas toliau transformuo-
jamas į tinkamą šeimininką, pvz., *E. coli* JM101, kaip
aprašyta aukščiau.

DNR, koduojanti *mpl* ligando mutantus su vienos ar
35 kelių amino rūgščių liekanų pakeitimais, gali būti
sukonstruota vienu iš keleto būdu. Jei norimos pakeisti

amino rūgščių liekanos yra greta polipeptidinėje grandinėje, tai jas galima pakeisti kartu, naudojant vieną oligonukleotidą, koduojantį visus amino rūgščių liekanų pakeitimus. Tačiau, jei tarp šių amino rūgščių liekanų
5 yra didesnis nei 10 amino rūgščių liekanų tarpas, tai pagaminti vieną oligonukleotidą, koduojantį visus pakeitimus, tampa labai sudėtingu uždaviniu. Tokiais atvejais reikia pasirinkti vieną iš dviejų galimų būdų.

Pirmuoju būdu pagaminami keli oligonukleotidai,
10 koduojantys po vieną amino rūgščių liekanų pakeitimą. Šių oligonukleotidų mišinys hibridinamas su matrica ir sintetinama antroji grandinė, kurioje bus užkoduoti visi norimi pakeitimai.

Antras būdas apima du ar kelis mutagenezės ciklus,
15 jei norima pagaminti norimą mutantą. Pirmame cikle, naudojant laukinio tipo DNR matricą ir oligonukleotidą, koduojantį pirmą iš norimų pakeitimų, pagaminamas heterodupleksas. Antrame mutagenezės cikle kaip matrica naudojama mutantinė DNR, pagaminta pirmame cikle.
20 Taigi, ši matrica jau turi vieną ar kelias mutacijas. Oligonukleotidas, koduojantis papildomų norimų amino rūgščių liekanų pakeitimus, hibridinamas su minėta matrica ir vykdoma DNR polimerizacijos reakcija. Susintetinta antroji grandinė koduoja mutacijas, įvestas į
25 DNR pirmame ir antrame mutagenezės cikluose. Ši DNR gali būti panaudojama kaip matrica trečiam mutagenezės ciklui ir taip toliau.

PCR mutagenėzė taip pat yra tinkamas būdas pagaminti *mpl* ligando polipeptido mutantinius variantus su
30 amino rūgščių liekanų pakeitimais. Nors žemiau aptariamas metodas taikomas DNR, reikia turėti omeny, kad jis gali būti taikomas ir RNR molekulėms. PCR metodas apima šias procedūras (žiūr. Erlich, *supra*, skyrius, parašytas R. Higuchi, p. 61-70): Naudojant nedidelius DNR
35 matricos kiekius ir pradmenis, kurių sekos truputį skiriasi nuo matricos DNR sekos, galima pagaminti

palyginti didelius kiekius DNR fragmentų, kurie skiriasi nuo matricos sekos tik tose vietose, kuriose skyrėsi pradmenys. Norint įterpti mutaciją į plazmidės DNR, vienas iš pradmenų turi persidengti su vieta, 5 kurioje norima padaryti mutaciją ir turi šią mutaciją koduoti; kito pradmens seka turi būti identiška sekai, esančiai bet kurioje komplementarios DNR grandinės vietoje. Geriau, kad antrąjį pradmenį atitinkanti seka būtų ne toliau, kaip 200 bazių atstumu nuo mutuojamos 10 vietos, tam kad amplifikuotą fragmentą būtų lengva sekvenuoti. Naudojant tokias poras pradmenų, PCR pagalba pagaminama DNR fragmentų populiacija, kuri skiriasi nuo pradinės DNR mutacijomis, įvestomis pirmuoju pradmenimi. Amplifikuotas fragmentas gali turėti ir kitų 15 mutacijų, nes kopijuojant matricą, gali įsivelti klaidos.

Jei matricos ir reakcijos produktų santykis yra ypatingai mažas, tai didžioji dauguma pagamintų fragmentų turės norimą mutaciją (mutacijas). Ši medžiaga 20 toliau naudojama pakeisti atitinkamą plazmidės vietą, taikant standartinius DNR konstravimo metodus. Mutacijas skirtingose pozicijose galima padaryti, naudojant antrą mutantinį pradmenį arba padarant antrą PCR su kitais pradmenimis; abiejų PCR produktai lygiagrečiai 25 įsiuvami į vektorių, naudojant tris (ar kelis) ligavimo etapus.

Konkrečiame PCR mutagenezės pavyzdyje plazmidinė DNR matrica (1 µg) linearizuojama, naudojant restrikcijos endonukleazę, turinčią tik vieną atpažinimo vietą 30 plazmidėje. Ši atpažinama vieta neturi būti amplifikuojamoje DNR dalyje. 100 ng tokios medžiagos įdedama į PCR mišinį, susidedantį iš PCR buferinio tirpalo, keturių dezoksiribonukleotidtrifosfatų (GeneAMP® rinkinys, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA) ir 25 pM kiekvieno oligonukleotidinio prad-

mens; galutinis reakcijos mišinio tūris yra 50 µl. Reakcijos mišinio viršuje užsluoksniuojama 35 µl mineralinės alyvos. Reakcijos mišinys denatūruojamas 5 minutes 100°C temperatūroje, atšaldomas, trumpam padėjus pavyzdžius į ledą, ir į mišinius po alyvą įdedama po 1 µl *Thermus aquaticus* (Taq) DNR polimerazės (5 V/µl, Perkin-Elmer Cetus). Reakcijos mišinys perkeliamas į DNA Thermal Cyclers aparatą (Perkin-Elmer Cetus). Aparatas programuojamas tokiu režimu:

10 2 min. 55°C
 30 sek. 72°C, po to seka 19 ciklų:
 30 sek. 94°C
 30 sek. 55°C ir
 30 sek. 72°C

15 Pasibaigus programai, mėgintuvėliai išimami iš aparato, vandeninė fazė pernešama į naujus mėgintuvėlius, ekstrahuojama fenolio/chloroformo mišiniu (50:50, t/t), DNR išsodinama etanolio ir išskiriama standartiniais metodais. Ši medžiaga toliau apdorojama
20 taip, kad būtų galima įterpti į vektorių.

Kitas mutagenezės variantas - kasečių mutagenėzė - pagrįstas metodu, aprašytu Wells et al., *Gene*, 34:315 [1985]. Pradinė medžiaga yra plazmidė (ar kiti vektoriai), turinti norimą pakeisti *mpl* ligando DNR. *Mpl* ligando DNR kodonas (kodonai), kurį norima pakeisti, identifikuojamas. Abejose būsimos mutacijos vietos galuose turi būti unikalios restrikcijos vietos. Jei tokių vietų nėra, tai jos turi būti įterptos į *mpl* ligando DNR, naudojant aukščiau aprašytą oligonukleotidų salygojamą mutagenėzę. Įvedus restrikcijos vietas, plazmidė linearizuojama, skaldant atitinkama restrikcijos endonukleaze. Standartiniais metodais sintetinamas dvigrandis oligonukleotidas, koduojantis seką, esančią tarp restrikcijos vietų ir turintis norimas mutacijas.
30 Oligonukleotidų grandinės sintetinamos atskirai ir
35

hibridinamos pagal standartinius metodus. Toks dvi-
grandis oligonukleotidas vadinamas kasete. Kasetės
sudarytos taip, kad jų 3' ir 5' galai atitiktų lineari-
zuotos plazmidės galus ir kad būtų galima juos sujungti
5 liguojant. Po ligavimo plazmidė turės mutantinę *mpl*
ligando DNR seką.

*C. Nukleino rūgšties įterpimas į replikuojamą
vektorių*

10 Nukleino rūgštis (pvz., kDNR ar genomine DNR), ko-
duojanti natyvų ar mutantinį *mpl* ligando polipeptidą,
įterpiama į replikuojamą vektorių tolesniam klonavimui
(DNR amplifikacijai) arba ekspresijai. Yra daug vekto-
rių, todėl tinkamo vektoriaus pasirinkimas priklauso
15 nuo: (1) ar jis bus panaudotas DNR amplifikacijai ar
DNR ekspresijai; (2) įterpiamos nukleino rūgšties dy-
džio; (3) ląstelės-šeimininkės, į kurią vektorius bus
įvedamas. Kiekviename vektoriuje yra įvairūs komponent-
tai, kurie priklauso nuo jo funkcijos (DNR amplifika-
20 cija ar DNR ekspresija) ir nuo ląstelės-šeimininkės,
kurioje jis bus pavartotas. Vektoriaus komponentai
paprastai apima, bet tuo neapsiribojama, vieną ar kelis
iš šių elementų: signalinę seką, replikacijos iniciaci-
jos vietą, vieną ar kelis markerinius genus, sustiprin-
25 toją, promotorių ir transkripcijos terminacijos seką.

(i) Signalinės sekos

Šiame išradime aprašomas *mpl* ligandas gali būti
ekspresuojamas ne tik tiesiogiai, bet ir kaip hibri-
30 dinis polipeptidas, kuriame *mpl* ligandas yra sulietas
su heterologiniu polipeptidu, geriau su signaline seka
arba su kitu polipeptidu, turinčiu specifinę skėlimo
vietą subrendusio baltymo ar polipeptido N gale. Signa-
linė seka gali būti vektoriaus komponentu arba *mpl*
35 ligando DNR dalimi ir kartu su šia DNR įterpiama į
vektorių. Reikia pasirinkti tokia signalinę seką, kuria

ląstelė-šeimininkas gali atpažinti ir paveikti (pvz., nuskelti signaline peptidaze). Prokariotinėse ląstelėse-šeimininkuose, kurie negali atpažinti ir nuskelti natyvios *mpl* ligando signalinės sekos, pastaroji pakeičiama į kokią nors prokariotinę signalinę seką, pvz., į šarminės fosfatazės, penicilinazės, lpp arba aukštai temperatūrai atsparaus endotoksino II signalinę seką. Siekiant sekrecijos mielėse, natyvią signalinę seką galima pakeisti, pvz., invertazės, alfa faktoriaus arba rūgštinės fosfatazės lyderinėmis sekomis, *C. albicans* gliukoamilazės lyderine seka (EP 362179, publikuotas 1990.04.04) arba signaline seka, aprašyta WO 90/13646, publikuotame 1990.11.15. Žinduolių ląstelėse gerai veikia natyvi signalinė seka (pvz., *mpl* ligando prebal-
tymas, įvykdantis *mpl* ligando sekreciją natyviose žin-
duolių ląstelėse *in vivo*), galima naudotis ir kitomis žinduolių signalinėmis sekomis, pvz., kitų *mpl* ligando polipeptidų signalinėmis sekomis ar kitų rūšių gyvūnų *mpl* ligando signalinėmis sekomis, tos pačios ar kitos rūšies gyvūnų sekretuojamų polipeptidų signalinėmis sekomis, o taip pat virusinių baltymų sekretoriniais lyderiais, pvz., *Herpes simplex* viruso gD baltymo signaline seka.

25 (ii) Replikacijos iniciacijos vietos

Abu, ekspresijos ir klonavimo, vektoriai turi nukleino rūgšties sekas, kurios įgalina vektoriaus replikaciją vienoje ar keliose ląstelėse-šeimininkuose. Paprastai klonavimo vektoriuose ši seka leidžia vektoriuui replikuotis nepriklausomai nuo šeimininko chromosominės DNR ir turi replikacijos iniciacijos vietą arba autonomiškai besireplikuojančias sekas. Tokios sekos gerai žinomos daugelyje bakterijų, mielių bei virusų. Plazmidės pBR322 replikacijos iniciacijos vieta tinkama daugumai Gram-neigiamų bakterijų, 2 μ plazmidės repli-

kacijos iniciacijos vieta tinkama mielėms, o įvairios virusinės kilmės (SV40, poliomos, adenovirusų, VSV ar BPV) replikacijos iniciacijos vietos naudojamos žinduolių ląstelių klonavimo vektoriuose. Paprastai žinduolių ekspresijos vektoriams replikacijos iniciacijos vieta nereikalinga (SV40 replikacijos iniciacijos vieta dažnai naudojama ekspresijos vektoriuose tik todėl, kad joje yra ankstyvasis promotorius).

Dauguma ekspresijos vektorių yra "šaudyklės" tipo vektoriai, tai yra tie, kurie gali replikuotis bent vienos organizmų klasės ląstelėse ir gali būti transfekuojami į kitas ląsteles, kuriose gali ekspresuotis. Pavyzdžiui, vektorius klonuojamas *E. coli* ląstelėse, o po to tuo pačiu vektoriumi transfekuojamas mielių arba žinduolių ląstelės, kuriose šis vektorius ekspresuojasi, nors ir negali replikuotis nepriklausomai nuo ląstelės-šeimininko chromosomos.

DNR galima taip pat amplifikuoti, įterpiant ją į šeimininko genomą. Tai nesunku padaryti, panaudojant, pvz., *Bacillus* genties bakteriją kaip šeimininką ir įterpiant į vektorių DNR seką, komplementarią *Bacillus* genominės DNR sekai. Įvedus tokį vektorių į *Bacillus* bakteriją, vyksta homologinė rekombinacija ir *mpl* ligando DNR įsiterpia į *Bacillus* genomą. Tačiau išskirti *mpl* ligando DNR iš genominės DNR sudėtingiau, nei iš automiškai besireplikuojančio vektoriaus, nes pirmuoju atveju *mpl* ligando DNR reikia pirma iškirpti iš genominės DNR restrikcijos fermentu.

(iii) Selekcijos genai

Ekspresijos ir klonavimo vektoriai turi turėti selekcijos geną, kitaip vadinamą selekcijos markeriu, toks genas koduoja baltymą, reikalingą transformuotų ląstelių išgyvenimui ar augimui selektyvioje augimo terpėje. Ląstelės-šeimininkai, netransformuotos vektoriumi, kuriame yra selekcijos genas, tokioje terpėje

neišgyvena. Tipiški selekcijos genai koduoja baltymus, kurie: (a) suteikia atsparumą antibiotikams arba kitiems toksinams, pvz., ampicilinui, neomicinui, metotreksatui ar tetraciklinui; (b) atstato autotrofinį fenotipą; arba (c) produkuoja būtinus mitybinius komponentus, kurių terpėje nėra, pvz., genas, koduojantis D-alaninracemazę *Bacillus* genties bakterijose.

Viename selekcijos pavyzdyje naudojamas reagentas, sustabdantis ląstelių-šeimininkų augimą. Ląstelės, kurios buvo sėkmingai transformuotos heterologiniu genu, ekspresuoja baltymą, suteikiantį atsparumą šiam reagentui ir tokiu būdu išgyvena selektyviomis sąlygomis. Tokios teigiamos selekcijos pavyzdžiuose naudojami reagentai yra neomicinas (Southern et al., *J. Molec. Appl. Genet.*, 1:327 [1982]), mikofenolio rūgštis (Mulligan et al., *Science*, 209:1422 [1980]) arba higromicinas (Sugden et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:410-413 [1985]). Trijuose aukščiau pateiktuose pavyzdžiuose naudojami bakteriniai genai, kontroliuojami eukariotiniais elementais ir suteikiantys atsparumą atitinkamai G418 ar neomicinui (geneticinui), xgpt (mikofenolio rūgščiai), arba higromicinui.

Kitų žinduolių ląstelėms tinkamų selekcijos markerių, įgalinančių identifikuoti transformuotas ląsteles, pavyzdžiai yra: dihidrofolatreduktazė (DHFR) ir timidinkinazė. Žinduolių ląstelių transformantai auginami tokiomis selektyviomis sąlygomis, kai adaptuotis ir išgyventi gali tik markerį turinčios ląstelės. Palaipsniui didinant selektyvaus agento koncentraciją, transformantai verčiami amplifikuoti selekcijos geną, o kartu ir DNR, koduojančią *mpl* ligando polipeptidą. Amplifikacija yra procesas, kai per keletą rekombinantinių ląstelių generacijų chromosomoje padidėja genokopijų skaičius, ir tos kopijos išdėstomos viena paskui kitą. Atitinkamai padidėja ligando sintezė.

Pavyzdžiui, ląstelės, transformuotos DHFR selekcijos genu, identifikuojamos auginant visus transformantus su metotreksatu (Mtx), kuris yra konkurentinis DHFR antagonistas. Tinkamos ląstelės-šeimininkai yra

5 Kinietiškų žiurkėnų kiaušidžių (CHO) ląstelių linija, neturinti DHFR aktyvumo. Ši ląstelių linija paruošiama ir auginama kaip aprašyta (Urlaub ir Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4216 [1980]). Transformantai auginami terpėje su vis didesne Mtx koncentracija. Tai

10 verčia ląstelę sintetinti vis daugiau DHFR geno kopijų ir lygiagrečiai daugiau visų kitų ekspresijos vektoriaus elementų, tarp jų ir DNR, koduojančios *mpl* ligandą, kopijų. Ši amplifikacijos metodą galima taikyti ir kitiems tinkamiems šeimininkams, pvz., ATCC Nr. CCL61

15 CHO-K1, kuris neperneša egzogeninio DHFR, ypač, jei naudojamas mutantinis DHFR genas, atsparus dideliems Mtx kiekiams (EP 117060). Kitas būdas yra ląsteles-šeimininkus (ypač laukinio tipo ląsteles, turinčias endogeninę DHFR) transformuoti ar kotransformuoti DNR

20 sekomis, koduojančiomis *mpl* ligandą, laukinio tipo DHFR baltymą ir kitą selekcijos markerį, pvz., aminogliukozid-3'-fosfotransferazę (APH), ir po to atrinkti transformantus terpėje su selektyviu agentu tokiu, kaip aminogliukozidinis antibiotikas, kanomicinas, neomicinas ar G418. (Žiūr. JAV patentą Nr.: 4965199).

Mielėse naudojamas selekcijos genas *trp1*, koduojamas mielių plazmidės YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, **282**:39 [1979]; Kingsman et al., *Gene*, **7**:141 [1979]; ir Tschemper et al., *Gene*, **10**:157 [1980]). *trp1* genas

30 suteikia selekcijos markerį mielių mutantams, nesugebantiems augti terpėje be triptofano, pvz., ATCC Nr. 44076 arba PEP4-1 (Jones, *Genetics*, **85**:12 [1977]). *Trp1* geno defektas mielių ląstelėse-šeimininkuose suteikia galimybę atrinkti transformantus, kurie skirtingai nei

35 šeimininkai gali augti terpėje be triptofano. Analogiš-

kai, *Leu2* defektyvius mielių ląstelių kamienus (ATCC Nr. 20622 arba 38626) galima transformuoti žinomomis plazmidėmis, turinčiomis *Leu2* geną.

5 (iv) *Promotoriai*

Ekspresijos ir klonavimo vektoriai paprastai turi promotorių, kuri gali atpažinti šeimininko organizmas, ir kuris funkcionaliai sujungtas su *mpl* ligando nukleino rūgštimi. Promotoriai yra netransliuojamos sekos, 10 lokalizuotos prieš struktūrinio geno pirmąją kodoną (iš 5' galo, 100 - 1000 bp atstumu) ir funkcionaliai sujungtos su tam tikra nukleino rūgšties seka, pvz., *mpl* ligando nukleino rūgšties seka, ir reguliuoja jos transkripciją ir transliaciją. Promotoriai suskirstomi 15 į dvi pagrindines klases: indukuojami promotoriai ir konstitutyvūs promotoriai. Indukuojami promotoriai yra tokie promotoriai, kurie inicijuoja kontroliuojamos DNR transkripciją, kai tam tikru būdu pasikeičia augimo sąlygos, pvz., kai terpėje atsiranda ar išnyksta koks 20 nors mitybinis komponentas, ar pasikeičia temperatūra. Žinoma daug promotorių, kuriuos atpažįsta įvairūs potencialūs šeimininkai. Šie promotoriai funkcionaliai sujungiami su *mpl* liganda koduojančia DNR, pašalinant restrikcijos fermentais natūralų šaltinio promotorių ir 25 įterpiant į vektorių norimą išskirtą promotorinę seką. Kaip natūralius *mpl* ligando promotorius, taip ir daugumą heterologinių promotorių galima panaudoti *mpl* ligando DNR amplifikacijai ir/arba ekspresijai. Geriau naudoti heterologinius promotorius, nes jie paprastai 30 suteikia galimybę pasiekti didesnę transkripcijos lygį ir didesnes ekspresuojamo *mpl* ligando išėigas, lyginant su natūraliu *mpl* ligando promotoriumi.

Promotoriai, tinkami naudoti prokariotinėse ląstelėse apima β -laktamazės ir laktozės promotorines sistemas (Chang et al., Nature, 275:615 [1978]; Goeddel et 35

al., *Nature*, **281**:544 [1979]), šarminės fosfatazės ir triptofano (trp) promotorinės sistemos (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, **8**:4057 [1980] ir EP 36776) ir hibridinius promotorius, pvz., tac promotorių (deBoer
5 et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:21-25 [1983]). Tinka ir kiti žinomi bakterijų promotoriai. Jų nukleotidinės sekos publikuotos ir patyręs specialistas gali juos funkcionaliai sujungti su *mpl* ligandą koduojančia DNR (Siebenlist et al., *Cell*, **20**:269 [1980]), naudoda-
10 masis linkeriais ir adapteriais norimoms restrikcijos vietoms sukonstruoti. Promotoriai, naudojami bakterijose, turi turėti Shine-Dalgarno (S.D.) seką, funkcionaliai sujungtą su DNR, koduojančią *mpl* ligandą.

Žinomi ir eukariotams tinkami promotoriai. Praktiškai visi eukariotų genai turi AT-turtingas sritis, lokalizuotas 25 - 30 bazių atstumu į 5' galą nuo transkripcijos iniciacijos vietos. Kita seka, randama 70 - 80 bazių atstumu į 5' galą nuo daugumos genų transkripcijos iniciacijos vietos, yra CXCAAT seka, kur X gali
20 būti bet koks nukleotidas. Daugumos eukariotų genų 3' gale yra seka AATAAA, kuri, matyt, gali būti signalu, reguliuojančiu poli-A uodegos prijungimą prie koduojančios sekos 3' galo. Visos šios sekos įterpiamos į tinkamas eukariotų ekspresijos vektorių vietas.

25 Promotoriai, tinkami naudoti mielėse, apima promotorius 3-fosfogliceratkinazei (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, **255**:2073 [1980]) ar kitiems glikolitiniams fermentams (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, **7**:149 [1968] ir Holland, *Biochemistry*, **17**:4900 [1978]),
30 tokiems kaip enolazė, gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazė, heksokinazė, piruvatdekarboksilazė, fosfofruktokinazė, gliukoz-6-fosfatizomerazė, 3-fosfogliceratmutazė, piruvatkinazė, triozfosfatizomerazė, fosfogliukozizomerazė ir gliukokinazė.

Kiti mielių promotoriai yra indukuojami promotoriai, turintys papildomą pranašumą, kad transkripcija reguliuojama augimo sąlygomis. Tokie promotoriai: alkoholdehidrogenazės 2, izocitochromo C, rūgštinės fosfatazės, degradacijos fermentų, susijusių su azoto metabolismu, metaltioneino, gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazės ir fermentų, atsakingų už maltozės ir galaktozės įsisavinimą, promotorinės sekos. Vektoriai ir promotoriai, naudojami ekspresijai mielėse, detaliam aprašyti Hitzeman et al., EP 73657(A). Mielių sustiprintojai sėkmingai naudojami kartu su mielių promotoriais.

Mpl ligando transkripcija nuo vektoriaus žinduolių ląstelėse-šeimininkuose kontroliuojama promotoriais, išskirtais iš virusų genomų, pvz., iš poliomos viruso, paukščių raupų viruso (UK 2211504, publikuotas 1989.07.05), adenovirusų (pvz., Adenoviruso 2), galvijų papiliomos viruso, paukščių sarkomos viruso, citomegalo viruso, retrovirusų, hepatito B viruso ir geriausiai iš Beždžionių Virusų 40 (SV40), o taip pat heterologiniais žinduolių promotoriais, pvz., aktino promotoriumi, imunoglobulino promotoriumi, temperatūrinio šoko promotoriais arba promotoriais, normaliai susijusiais su mpl ligando seka, jei šie natūralūs promotoriai suderinami su kitomis ląstelės-šeimininko sistemomis.

Ankstyvasis ir vėlyvasis SV 40 viruso promotoriai paprastai gaunami kaip SV40 restrikcijos fragmentas, turintis taip pat SV40 viruso replikacijos iniciacijos vietą (Fiers et al., *Nature*, 273: 113 [1978]; Mulligan ir Berg, *Science*, 209:1422-1427 [1980]; Pavlakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7398-7402 [1981]). Ankstyviausias žmogaus citomegalo viruso promotorius išskiriamas kaip HindIII E restrikcijos fragmentas (Greenaway et al., *Gene*, 18:355-360 [1982]). Sistema, tinkama DNR ekspresijai žinduolių ląstelėse-šeiminin-

kuose, naudojant galvijų papilomos virusą, aprašyta JAV patente Nr. 4419446. Šios sistemos modifikacija aprašyta JAV patente Nr. 4601978. Taip pat žiūr. Gray et al., *Nature*, **295**:503-508 [1982] apie imuninio interferono kDNR ekspresiją beždžionių ląstelėse; (Reyes et al., *Nature*, **297**:598-601 [1982] apie žmogaus β -interferono kDNR ekspresiją pelių ląstelėse, naudojant timidinkinazės promotorių iš *Herpes simplex* viruso; (Canaani ir Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**:5166-5170 [1982]; apie žmogaus interferono $\beta 1$ geno ekspresiją kultivuojamose pelių bei triušiu ląstelėse; ir Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**:6777-6781 [1982] apie bakterijų CAT sekų ekspresiją beždžionių inkstų ląstelių linijoje CV-1, viščiukų embrionų fibroblastuose, Kinietišku žiurkėnių kiaušidžių ląstelių linijoje, HeLa ląstelėse ir pelių NIH-3T3 ląstelėse, naudojant promotoriumi Rous'o sarkomos viruso ilgąją galinę pasikartojančią seką.

20 (v) Sustiprinantys elementai

DNR, koduojančios šiame išradime pateiktą *mpl* ligandą, transkripcija aukštesniuose eukariotuose dažnai padidėja, kai į vektorių įterpiama sustiprintojo seka. Sustiprintojai yra *cis*-padėtyje veikiantys DNR elementai, paprastai nuo 10 iki 300 bp ilgio, kurie veikia promotorių, taip padidindami transkripciją. Sustiprintojai yra sąlyginai nepriklausomi nuo padeties ir orientacijos DNR sekoje, jie buvo rasti kiek 5' (Laimins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:993 [1981]), tiek ir 3' transkripcijos vieneto galuose (Lusky et al., *Mol. Cell Bio.*, **3**:1108 [1983]), taip pat viduryje introno (Banerji et al., *Cell*, **33**:729 [1983]), ir pačioje koduojančioje sekoje (Osborne et al., *Mol. Cell Bio.*, **4**:1293 [1984]). Žinoma daug sustiprintųjų sekų iš žinduolių genų (globino, elastazės, albumino,

α -fetoproteino ir insulino). Paprastai dažniau naudojami eukariotinių ląstelių virusų sustiprintojai, pastarieji apima: SV40 sustiprintoją, esantį vėlyvojoje replikacijos iniciacijos vietos pusėje (100-270 bp),
5 citomegalo viruso ankstyvojo promotoriaus sustiprintoją, poliomos viruso sustiprintoją, esantį vėlyvojoje replikacijos iniciacijos vietos pusėje ir adenovirusų sustiprintojus. Žiūrėk taip pat (Yaniv, Nature, 297:17-18 [1982]) apie sustiprinančius elementus, taikomus
10 eukariotų promotorių aktyvacijai. Sustiprintoją galima įterpti į 5' arba 3' *mpl* ligandą koduojančios sekos galą, bet geriau jį įterpti į vietą, esančią prie promotoriaus 5' galo.

15 (vi) *Transkripcijos terminacijos elementai*

Ekspresijos vektoriai, naudojami eukariotinėse ląstelėse-šeimininkuose (mielėse, grybuose, vabzdžių, augalų, gyvūnų, žmogaus ląstelėse arba kitų daugialasčių organizmų branduolį turinčiose ląstelėse) turi
20 turėti sekas, reikalingas transkripcijos terminacijai ir iRNR molekulių stabilizavimui. Tokios sekos paprastai būna eukariotų arba virusų DNR arba kDNR 5' arba, rečiau, 3' netransliuojamose dalyse. Šios dalys turi nukleotidų segmentus, kurie transkribuojami kaip poliadenilinti fragmentai netransliuojamoje *mpl* ligandą
25 koduojančios iDNR dalyje.

(vii) *Vektorių konstravimas ir analizė*

Tinkamų vektorių, turinčių vieną ar kelis aukščiau
30 išvardintus elementus, konstravimas remiasi standartiniais ligavimo metodais. Išskirtos plazmidės arba DNR fragmentai skaldomi, prie gautų fragmentų padaromi lipnūs galai ir jie liguojami tokia tvarka, kad būtų gaunamos norimos plazmidės.

Norint įsitikinti, kad sukonstruotos plazmidės seka yra teisinga, ligavimo mišiniu transformuojamas *E. coli* K12 kamienas 294 (ATCC Nr. 31446), ir transformantai atrenkami pagal atsparumą ampicilinui ar tetraciklinui.

5 Iš transformantų išskiriamos plazmidės ir analizuojamos restrikcine analize ir/arba sekvenuojamos pagal Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:309 [1981] arba pagal Maxam et al., *Methods in Enzymology*, 65:499 [1980].

10 (viii) Vektoriai laikinajai ekspresijai

Šio išradimo įgyvendinimui labai naudingi ekspresijos vektoriai, kurie taikomi, siekiant *mpl* ligando polipeptidą koduojančios DNR laikinosios ekspresijos žinduolių ląstelėse. Paprastai laikinajai ekspresijai

15 taikomi ekspresijos vektoriai, sugebantys efektyviai replikuotis ląstelėse-šeimininkuose. Tuo būdu ląstelėje susikaupia daug ekspresijos vektoriaus kopijų ir atitinkamai sintetinami dideli norimo polipeptido, koduojamo ekspresijos vektoriumi, kiekiai (Sambrook et al.,

20 *supra*, pp. 16.17 - 16.22). Laikinosios ekspresijos sistemos, susidedančios iš tinkamo ekspresijos vektoriaus ir ląstelės-šeimininko, įgalina identifikuoti polipeptidus, koduojamus klonuotomis DNR, o taip pat greitai analizuoti tokių polipeptidų biologines ir fiziologines

25 savybes. Taigi, laikinosios ekspresijos sistemos ypač naudingos šiame išradime identifikuojant *mpl* ligando polipeptido analogus ir variantus, kurie pasižymi *mpl* ligando polipeptido biologiniu aktyvumu.

30 (ix) Tinkami pavyzdiniai stuburinių gyvūnų ląstelių vektoriai

Kiti metodai, vektoriai ir ląstelės-šeimininkai, tinkamos *mpl* ligando sintezei rekombinantinėse stuburinių gyvūnų ląstelių kultūros, yra aprašyti Gething et

35 al., *Nature*, 293:620-625 [1981]; Mantei et al., *Nature*,

281:40-46 [1979]; Levinson et al.; EP 117060 ir EP 117058. Geriausiai tinkama *mpl* ligando ekspresijai žinduolių ląstelėse plazmidė yra pRK5 (EP 307247; JAV patentas Nr. 5258287) arba pSVI6B (PCT publikacija Nr. 5 WO 91/08291).

D. Ląstelių-šeimininkų atranka ir transformavimas

Tinkamos ląstelės-šeimininkai vektorių klonavimui ar ekspresijai yra prokariotų ląstelės, mielės ar aukštesniųjų eukariotų ląstelės, aprašytos aukščiau. Tinkami prokariotai apima *Eubacteria*, Gram-neigiamas ar Gram-teigiamas, pavyzdžiui, *E. coli*, *Bacilli* rūšys, pvz., *B. subtilis*, *Pseudomonas* rūšis, pvz., *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ar *Serratia marcescans*. 15 Geriausias klonavimui *E. coli* kamienas yra *E. coli* 294 (ATCC Nr. 31446), nors ir kiti kamienai yra tinkami klonavimui: *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC Nr. 31537) ir *E. coli* W3110 (ATCC Nr. 27325). Šie pavyzdžiai pateikti iliustracijai, o ne apribojimui. Palankiausia, 20 kai ląstelės-šeimininkai sekretuoja minimalius kiekius proteinazių. Taip pat atliekami klonavimo darbai *in vitro*, pvz., PCR ar kitos nukleino rūgščių polimerazinės reakcijos.

Be prokariotinių ląstelių, gali būti naudojami 25 šeimininkais *mpl* ligandą koduojantiems vektoriams eukariotiniai mikroorganizmai, pvz., siūliniai grybai ar mielės. *Saccharomyces cerevisiae* ar paprastos kepimo mielės dažniausiai naudojamos iš žemesniųjų eukariotinių mikroorganizmų. Daugelis mikroorganizmų iš kitų 30 genčių, rūšių ir kiti mikroorganizmų kamienai yra paprastai prieinami ir gali būti naudojami šiame išradime. Pavyzdžiui, *Schizosaccharomyces pombe* (Beach ir Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; EP 139383, publikuotas 1985.05.02), *Kluyveromyces* (JAV patentas Nr. 4943529, 35 pvz., *K. lactis* (Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 737

[1983]), *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans* ir *K. marxianus*, *Yarrowia* [EP 402226], *Pichia pastoris* (EP183070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, **28**:265-278 [1988]), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244234), *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, **76**:5259-5263 [1979]); siūliniai grybai, pvz., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, publikuotas 1991.01.10), *Aspergillus*, pvz., *A. niddulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, **26**:205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1470-1474 [1984]) ir *A. niger* (Kelly ir Hynes, *EMBO J.*, **4**:475-479 [1985]).

Ekspresuoti glikozilintam *mpl* ligandui tinkamos ląstelės-šeimininkės yra kilusios iš daugialasčių organizmų. Tokios ląstelės pasižymi kompleksiniu procesingu ir glikozilinimo aktyvumu. Iš principo galima naudoti bet kokias aukštesniųjų eukariotų ląsteles kaip iš stuburinių, taip ir iš bestuburių gyvūnų. Bestuburių gyvūnų ląstelių pavyzdžiai yra augalų ir vabzdžių ląstelės. Gali būti naudojamos daugelio bakulovirusų kamienų ir variantų ir atitinkamų vabzdžių ląstelės iš *Spodoptera frugiperda* (vikšras), *Aedes aegypti* (moskitas), *Aedes albopictus* (moskitas), *Drosophila melanogaster* (vaisinė muselė) ir *Bombyx mori*. Žiūrėk, pavyzdžiui, Luckow et al., *Bio/Technology*, **6**:47-55 [1988]; Miller et al., *Genetic Engineering*, Setlow et al. eds., Vol.8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; ir Maeda et al., *Nature*, **315**:592-594 [1985]. Daugelis virusų kamienų yra prieinami transfekcijai, pvz., *Autographa californica* NPV L-1 variantas ir Bm-5 kamienas *Bombyx mori* NPV ir kiti virusai, ir tokie virusai, kaip ir šiame išradime naudojamas virusas, gali būti naudojami čia aprašytais

būdais, ypač transfekuoiant *Spodoptera frugiperda* ląsteles.

Augalų audinių kultūros iš medvilnės, kukurūzų, bulvių, sojos pupelių, petunijų, pomidorų ir tabako gali būti naudojamos kaip šeimininkai. Augalų kultūros ląstelės paprastai transfekuojamos inkubuojant su tam tikrais bakterijų *Agrobacterium tumefaciens* kamienais, kuriose prieš tai buvo įterpta *mpl* ligando DNR. Augalų ląstelių kultūros inkubacijos su *A. tumefaciens* metu, DNR, koduojanti *mpl* ligandą, pernešama į augalo ląsteles; ląstelės tampa transfekuotos ir tam tikromis sąlygimis ekspresuoja *mpl* ligando DNR. Yra reguliatorinės ir signalinės sekos, tinkamos augalų kultūros ląstelėms, pvz., nopalinsintetazės promotorius ir poliadenilinio signalinės sekos (Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1:561 [1982]). Taip pat yra išskirtas DNR segmentas, esantis T-DNR prieš geną 780, kuris sugeba aktyvuoti arba padidinti augalų ekspresuojamų genų transkripcijos lygį rekombinantinę DNR turinčiose augalų kultūros ląstelese. EP 321196, publikuotas 1989.06.21.

Bet labiausiai įdomios yra stuburinių gyvūnų ląstelės, ir stuburinių gyvūnų ląstelių dauginimas kultūroje (audinių kultūros) dabar jau yra rutininė procedūra (Tissue Culture, Academic Press, Kruse ir Patterson, redaktoriai [1973]). Žinduolių ląstelių šeimininkų linijų pavyzdžiai yra: beždžionės inkstų CV1 linijos ląstelės, transformuotos SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); žmogaus embriono inkstų ląstelių linija (293 ar 293 linijos ląstelės, subklonuotos, kad galėtų augti suspensinėje kultūroje, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 [1977]); jauniklių žiurkėnų inkstų ląstelės (BHK, ATCC CCL 10); Kinietišku žiurkėnų kiaušidžių ląstelės (DHFR) (CHO, Urlaub ir Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); pelių sertoli ląstelės (TM4,

Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 [1980]); beždžionių inkstų ląstelės (CV1 ATCC CCL 70); Afrikos žaliųjų beždžionių inkstų ląstelės (VERO-76, ATCC CRL-1578); žmogaus gimdos kaklelio karcinomos ląstelės (HELA, ATCC CCL 2); šuns inkstų ląstelės (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo žiurkių kepenų ląstelės (BRL 3A, ATCC CRL 1442); žmogaus plaučių ląstelės (W138, ATCC CCL 75); žmogaus kepenų ląstelės (Hep G2, HB 9065); pelių pieno liaukų auglio ląstelės (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI ląstelės (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 [1982]); MRC 5 ląstelės; FS4 ląstelės ir žmogaus hepatomos linija (Hep G2).

Ląstelės-šeimininkai transfekuojamos ir transformuojamos šiame išradime aukščiau aprašytais ekspresijos ar klonavimo vektoriais; ląstelės kultivuojamos bendrai priimtinoje maitinimo terpėje, papildant jas, kad būtų indukuojami promotoriai; atrenkami transformantai ar amplifikuojami genai, koduojantys tikslines sekas.

Transfekcija vadinamas procesas, kai į ląstelę įvedamas vektorius, nepriklausomai nuo to, ar vyksta kokios nors koduojančios sekos ekspresija. Specialistams yra žinoma daug transfekcijos metodų, pvz., kalcio fosfatinis metodas, elektroporacija. Pasisekusi transfekcija paprastai įvertinama pagal bet koki vektoriaus veikimo pasireiškimą ląstelėje-šeimininke.

Transformacija vadinamas procesas, kai į organizmą įvedama DNR taip, kad vyktų jos replikacija arba kaip ekstrachromosominio elemento, arba integruojantis į ląstelės-šeimininko chromosomą. Priklausomai nuo pasirinkto šeimininko, transformacija atliekama standartiniais metodais, tinkančiais šiam konkrečiam šeimininkui. Ląstelių paveikimas kalcio chloridu (žiūr. skyrių 1.82, Sambrood et al., *supra*) paprastai taikomas prokariotinėms ląstelėms arba kitoms, turinčioms ląstelės sienelės barjerą. Transformuojant augalų ląsteles, naudojamas užkrėtimas *Agrobacterium tumefaciens*, tai

aprašyta Shaw et al., *Gene*, **23**:315 [1983] ir WO 89/05859, publikuotame 1989.06.29. Be to, augalų ląstelės gali būti transfekuojamos paveikiant ultragarsu, kaip aprašyta patente WO 91/00358, publikuotame 5 1991.01.10. Žinduolių ląstelėms, kurios neturi ląstelių sienelės, geriau taikyti kalcio fosfatinį metodą, aprašytą Graham ir van der Eb, *Virology*, **52**:456-457 [1978]. Bendri žinduolių ląstelių-šeimininkų transformacijos aspektai aprašyti Axel JAV patente Nr. 4399216, 10 publikuotame 1983.08.16. Mielų ląstelių transformacija paprastai vykdoma pagal metodus, aprašytus Van Solingen et al., *J. Bact.*, **130**:946 [1977] ir Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:3829 [1979]. Taip pat galima naudoti ir kitus DNR įvedimo metodus, pvz., injekciją į 15 branduolį, elektroporaciją arba protoplastų suliejimą.

E. Ląstelių-šeimininkų kultivavimas

Prokariotų ląstelės, naudojamos šiame išradime *mpl* ligando polipeptido produkcijai, kultivuojamos tam tik- 20 kamoje terpėje, kaip aprašyta Sambrook et al., *supra*.

Šiame išradime žinduolių ląstelės-šeimininkai, naudojamos *mpl* ligando produkcijai, gali būti kultivuojamos įvairiose terpėse. Ląstelių-šeimininkų kultivavimui gali būti naudojamos komercinės terpės: Ham F10 25 (Sigma), minimali pagrindinė terpė ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) ir Dulbecco modifikuota Eagle terpė (DMEM, Sigma). Taip pat ląstelių-šeimininkų auginimui gali būti naudojama bet kuri terpė, aprašyta šiuose šaltiniuose: Ham ir Wallace, *Meth. Enz.*, **58**:44 [1979], 30 Barnes ir Sato *Anal. Biochem.*, **102**:255 [1980], JAV patentuose: 4767704; 4657866; 4927762 arba 4560655; WO 90/03430; WO 87/00195; JAV patento Re. 30985; ir paraiškose USSN 07/592107 ar 07/592141, abi pateiktos 1990.10.03. Visų išvardintų terpių panaudojimas lai- 35 komas atitinkančiu šiuo išradimu. Bet kuri čia aprašyta

terpė gali būti papildoma, jei tai būtina, hormonais ir/arba kitais augimo faktoriais (pvz., insulinu, transferinu ar epiderminiu augimo faktoriumi), druskomis (pvz., natrio chloridu, kalcio, magnio druskomis ir fosfatais), buferinėm medžiagomis (pvz., HEPES), nukleozidais (pvz., adenozinu ir timidinu), antibiotikais (pvz., GentamicinuTM), mikroelementais (pvz., neorganiniais junginiais, paprastai jų koncentracija būna keli μM) ir gliukoze ar ekvivalentišku energijos šaltiniu. Kiti terpės priedai, žinomi šios srities specialistams, taip pat gali būti naudojami tinkamomis tam koncentracijomis. Ląstelių-šeimininkų, pasirinktų baltymų ekspresijai, kultivavimo sąlygos: temperatūra, pH ir kt., parenkamos specialistams žinomais būdais.

Šiame išradime ląstelės-šeimininkai apima ląsteles, kultivuojamas *in vitro* ir ląsteles, kurios yra pačiuose gyvūnuose.

F. Geno amplifikacijos/ekspresijos nustatymas

Geno amplifikacija ir/arba ekspresija gali būti įvertinama tiesiogiai mėginyje, pavyzdžiui, įprastais Southern blotavimu, northern blotavimu įvertinant iRNR transkripciją (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:5201-5205 [1980]), dot hibridizacija (DNR analize), arba hibridizacija *in situ*, naudojant tinkamai pažymėtus zondus, pasirenkamus pagal pateiktas šiame išradime sekas. Galima naudoti įvairius žymėjimo būdus, labiausiai įprastas yra žymėjimas radioizotopais, ypač ³²P. Bet galima naudoti ir kitokius metodus, pvz., biotinu modifikuotus nukleotidus įterpti į polinukleotidą. Prie biotino gali jungtis avidinas ar antikūnai, kurie gali būti pažymimi įvairiomis žymėmis, pvz., radioizotopais, fluoresceentinėmis žymėmis, fermentais ar kitais būdais. Taip pat gali būti naudojami antikūnai, atpažįstantys specifinius duplexus, pvz., DNR duplexus, RNR duplex-

sus ir DNR-RNR hibridinius dupleksus ar DNR-baltymo dupleksus. Naudojami antikūnai gali būti pažymėti ir matavimas gali būti atliekamas, kai dupleksas sorbuojamas ant paviršiaus, kad, formuojantis ant paviršiaus dupleksams, būtų galima nustatyti prisijungusius prie duplekso antikūnus.

Taip pat geno ekspresija gali būti įvertinama imunologiniais metodais, pvz., atliekant imunohistocheminę audinių pjūvių dažymą, o taip pat analizuojant audinių kultūrų terpes arba organizmo skysčius, tokiu būdu tiesiogiai įvertinant geno ekspresijos produktą. Atliekant imunohistocheminio dažymo analizę, ląstelių mėginiai paprastai paruošiami dehidratuojant ir užfiksuojant ląsteles, po to seka reakcija su žymėtais antikūnais, specifiniais imobilizuotam geno produktui. Paprastai šios žymės yra matomos, pvz., fermentinės žymės, fluorescuojančios žymės, liuminescuojančios žymės ir kitos. Tinkamiausias šiam išradimui ypač jautrus dažymo metodas yra pateiktas Hsu, et al., *Am. J. Clin. Path.*, 75:734-738 [1980].

Imunocheminiam dažymui ir/arba mėginių tirpalų tyrimui naudojami kaip monokloniniai, taip ir polikloniniai antikūnai. Jie gali būti gaunami iš bet kurių žinduolių. Antikūnai gali būti pagaminti prieš natyvų *mpl* ligando polipeptidą ar prieš sintetinį polipeptidą, kuris yra susintetintas pagal DNR sekas, pateikiamas žemiau.

G. mpl ligando polipeptido gryninimas

Patogiausia, kai *mpl* ligandas yra išskiriamas iš kultūrinės terpės, į kurią jis yra sekretuojamas, nors taip pat gali būti išskirtas iš ląstelių-šeimininkų lizato, kai baltymas yra ekspresuojamas be signalinės sekos.

Kai *mpl* ligandas yra ekspresuojamas rekombinantinėse ląstelėse, skirtingose nuo žmogaus ląstelių, tai

mpl ligando preparatuose nebūna kitų žmogaus polipeptidų ar baltymų. Bet šiuo atveju yra būtina *mpl* liganda išgryninti nuo rekombinantinių ląstelių baltymų ar polipeptidų, norint gauti išgrynintą, homogenišką *mpl* ligando preparatą. Pirmoje gryninimo stadijoje kultūrinė terpė ar ląstelių lizatas yra centrifūguojami, siekiant pašalinti ląstelių nuolaužas. Ląstelių membranos ir tirpūs baltymai yra atskiriami. Taip pat gali būti naudojami ir komerciniai, skirti baltymams koncentruoti, filtrai (pvz., Amicon ar Millipore ultrafiltracinė įranga). *mpl* ligandas gali būti gryninamas iš tirpių baltymo frakcijos ir iš ląstelių lizato membranos frakcijos, priklausomai nuo to, ar *mpl* ligandas yra įsijungęs į membraną. *mpl* ligandas toliau gryninamas nuo pašalinių tirpių baltymų ar polipeptidų išsodinant jį druskomis ar jonų mainų chromatografija, ar chromatografuojant kitais sorbentais. Naudojamos matricos gali būti: akrilamidas, agarozė, dekstranas, celiuliozė ir kitos matricos, paprastai naudojamos baltymų gryninimui. Chromatografinės procedūros, tinkamos baltymų gryninimui, yra: imunoafininė chromatografija (pav., anti-*hmpl* ligando Mab), receptorinė chromatografija (pvz., *mpl*-IgG, ar protein A Sepharose), hidrofobinės sąveikos chromatografija (HIC) (pvz., esterio, butilo ar fenilo Toyopearl), lektino chromatografija (pvz., Con A-Sepharose, lentil-lectin-Sepharose), gelfiltracija (pvz., Sephadex G-75), katijonų ir anijonų mainų chromatografija (pvz., DEAE ar karboksimetil- ir sulfopropil-celiuliozė), ir atvirkščių fazių didelio efektyvumo skystinė chromatografija (RP-HPLC) (žiūr. pvz., Urdal et al., J. Chromatog., 296:171 [1984], kur dvi viena po kitos einančios RP-HPLC stadijos yra naudojamos rekombinantinio IL-2 gryninimui). Kitos gryninimo stadijos paprastai būna: išsodinimas etanolio, išsodinimas

amonio sulfatu, chromatofokusavimas, preparatyvinė SDS PAGE ir kitos.

mpl ligando variantai, kuriuose amino rūgščių liekanos yra pašalintos, įterptos ar pakeistos, yra išskiriami taip pat, kaip ir natyvus *mpl* ligandas, turint omeny savybių pokyčius *mpl* ligando variantuose. Pavyzdžiui, gryninant *mpl* ligando junginį su kitu baltymu ar polipeptidu, pvz., bakteriniu virusiniu antigenu, galima atlikti imunoafininę chromatografiją, naudojant sorbentą su antikūnais prieš antigeną, kadangi šis sorbentas sugeba sorbuoti sulietą polipeptidą. Taip pat *mpl* ligandas gali būti išgryninamas afinine chromatografija, naudojant išgrynintus *mpl*-IgG, imobilizuotus gerai žinomais būdais (geriausiai) prie sorbento, tokio kaip Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Richmond, CA) ar panašaus. Proteinazių inhibitorius, toks kaip fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF), turi būti naudojamas, norint išvengti proteolitinės degradacijos valymo metu, antibiotikai turi būti naudojami, norint išvengti atsitiktinio užkrato augimo. Šios srities specialistas gali įvertinti, kaip gryninimo metodai, tinkami natyviame *mpl* ligandui, turi būti modifikuojami, kai gryninamas *mpl* ligandas ar jo variantai iš kitų rekombinantinių ląstelių kultūros.

25

H. mpl ligando polipeptido kovalentinės modifikacijos

mpl ligando polipeptidų kovalentinės modifikacijos yra šio išradimo sudėtinė dalis. Kaip natyvus *mpl* ligandas, taip ir *mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekos variantai gali būti kovalentiškai modifikuoti. Vienas kovalentiškai modifikuoto *mpl* ligando tipas, aprašytas šiame išradime, yra *mpl* ligando fragmentas. *Mpl* ligando fragmentų variantai, kurių sudėtyje yra apie 40 amino rūgščių liekanų, gali būti paruošti

35

chemiškai sintetinant ar fermentiniu ar cheminiu būdu skaldant pilno ilgio *mpl* ligando polipeptidą ar jo variantą. Kiti *mpl* ligando ar jo fragmentų kovalentinės modifikacijos variantai yra molekulė įterpiama į taikinio *mpl* ligando ar jo fragmento amino rūgščių liekana organiniu modifikuojančių agentu, kuris sugeba reaguoti su pasirinkta vieta grandinėje ar su N ar C galinėmis amino rūgščių liekanomis.

Cisteinilo liekanos paprastai modifikuojamos α -halogenacetatais (ir atitinkamais aminais), tokiais, kaip choracto rūgštis ar chloracetamidas, susidarant karboksimetil- ar karboksiamidometilo dariniams. Cisteinilo liekanos taip pat gali būti paveiktos bromtrifluor-acetonu, α -brom- β -(5-imidozoil)propiono rūgštimi, chloracetilfosfatu, N-alkilmaleinimidais, 3-nitro-2-piridildisulfidu, metil-2-piridildisulfidu, p-chlor-mercuribenzoatu, 2-chlormercuri-4-nitrofenoliu ar chlor-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazolu.

Histidilo liekanos modifikuojamos dietilpirokarbonatu, kai pH 5,5-7,0, nes šis reagentas yra santykinai selektyvus šoninei histidilo grandinei. Taip pat gali būti naudojamas bromofenilacetilbromidas, reakcija vykdoma 0,1 M natrio kokodilato tirpale, esant pH 6.0.

Lizinilo ir N galinės amino rūgščių liekanos modifikuojamos gintaro rūgšties ar kitais karboksilininiais anhidridais. Modifikuojant šiais agentais, pakeičiamas liekanos krūvis į priešingą lizinilui krūvį. Kiti amino grupės turinčių liekanų modifikavimui tinkami reagentai apima imidoesterius, tokius, kaip metilpikolinimidatas; piridoksalfosfatas; pirodoksalis, chlorborhidridas, trinitrobenzensulfo rūgštis, O-metilizokarbamidas, 2,4-pentandiolis ir transaminaze katalizuojama reakcija su glioksilatu.

Arginilo liekanos modifikuojamos vienu ar keliais įprastais reagentais, tarp jų: fenilglioksalis, 2,3-bu-

tandionas, 1,2-cikloheksandionas ir ninhidrinas. Modifikuojant arginilo liekanas, reakcija turi būti atliekama šarminėje terpėje dėl aukštos guanidino grupės pK_a . Šie reagentai taip pat gali reaguoti ir su lizino

5 grupe, taip kaip ir su arginino liekanos ϵ -amino grupe.

Specifinė tirozilo liekanos modifikacija gali būti atliekama, norint įvesti spektrometrines žymes, vykdant reakciją su aromatiniais diazonio junginiais arba su tetranitrometanu. Paprastai naudojami N-acetilimidizolas ir tetranitrometanas, reakcijos metu susidaro

10 O-acetiltirozilo junginiai ir 3-nitro dariniai, atitinkamai. Per tirozilo liekanas įvedamas radioaktyvus jodas chloramino T metodu, aprašytu aukščiau, tam naudojamas ^{125}J ar ^{131}J , ir tokie dariniai yra naudojami

15 radioimunoanalizėje.

Šoninės karboksilinės grupės (aspartilo ar glutamilo) selektyviai modifikuojamos reakcijomis su karbodiimidais ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$), kur R ir R' yra skirtingos alkilo liekanos. Tokie karbodiimidai gali būti 1-cikloheksil-3-(2-morfonilil-4-etil)karbodiimidas arba 1-

20 etil-3-(4-azonio-4,4-dimetilpentil)karbodiimidas. Asparagino ir glutamino rūgščių liekanos gali būti pakeistos su amonio jonais į asparaginilo ir glutaminilo liekanas.

Modifikavimas su difunkciniais agentais yra tinkamas *mpl* ligando prisiuvimui prie vandenyje netirpios matricos arba paviršiaus, kad gryninant būtų galima naudoti anti-*mpl* ligando antikūnus ir atvirkščiai. Įprastai naudojami susiuvantys agentai yra šie: pvz.,

30 1,1-di(diazoacetil)-2-feniletanas, glutaraldehydas, N-hidroksisukcinimido esteris, pavyzdžiui 4-azidosalicilo rūgšties esteris, homodifunkcionalus imidoesteris, įskaitant disukcinimidilesterį tokį, kaip 3,3'-ditio-

bis(sukcinimidilpropionatas), ir difunkcionalūs maleimidai, tokie, kaip bis-N-maleinimido-1,8-oktanas. Mo-

35 difikaujantys agentai, tokie, kaip metil-3-[(p-azido-

fenil)ditio]propioimidatas, sudaro fotoaktyvius tarpi-
nius produktus, kuriuos galima susiūti (prijungti) pa-
veikus šviesa. Taip pat baltymų imobilizacijai gali
būti naudojamos reakcingos, vandenyje netirpios matri-
cos tokios, kaip cianbromidu aktyvuoti angliavandeniai,
5 ir reakcingos matricos, aprašytos JAV patentuose:
3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; ir
4330440.

Glutaminilo ir asparagilo liekanos yra dažnai
10 deamidinamos iki atitinkamų glutamilo ir aspartilo
liekanų. Šios liekanos deamidinamos neutralioje arba
šarminėje terpėje. Deamidintos šių liekanų formos taip
pat yra šio išradimo dalis.

Kitos modifikacijos apima prolino ir lizino hidro-
15 ksilinimą, serino ar treonino hidroksilinių grupių
fosforilinimą, lizino, arginino ir histidino šoninių
grandinių α -amino grupių metilinimą (T.E. Creighton,
Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H.
Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), N galo
20 amino grupės acetilinimą ir bet kokios C galinės
karboksilinės grupės amidinimą.

Kiti *mpl* ligando polipeptido kovalentinės modi-
fikacijos tipai, esantys šio išradimo sferoje, apima
natyvaus polipeptido glikozilinimo pakeitimus. Tai
25 reiškia vieno ar kelių angliavandenių komponentų,
sutinkamų natyviame *mpl* ligande, pašalinimą ir/arba
vieno ar kelių angliavandenių, nesutinkamų natyviame
mpl ligande, pridėjimą.

Paprastai polipeptidų glikozilinimas būna per N
30 atomą arba per O atomą. N glikozilinimas vyksta,
prijungiant angliavandens grandinę prie asparagino
liekanos. Tripeptidinės sekos: asparaginas-X-serinas ir
asparaginas-X-treoninas, kur X yra bet kokia amino
rūgščių liekana, išskyrus prolino liekaną, yra ferment-
35 tiniu būdu atliekamo angliavandens grandinės prijun-
gimo prie asparagino liekanos vieta. Taigi, kai yra šių

trijų amino rūgščių liekanų tokios sekos, tai polipeptidas turi potencialią glikozilinio vietą. O glikozilinimas vyksta prijungiant vieną kurį nors angliavandenį - N-acetilgalaktozaminą, galaktozę ar ksilozę prie
5 hidroksiamino rūgšties liekanos, paprastai prie serino ar treonino liekanos; bet gali jungtis ir prie 5-hidroksiprolino ar 5-hidroksilizino liekanų.

Papildomos glikozilinio vietos *mpl* ligando polipeptide yra padaromos, pakeičiant amino rūgščių liekanas taip, kad būtų vienas ar keli aukščiau aprašyti tripeptidai (N glikozilinimas). Glikozilintų polipeptidų variantai gali būti padaromi, papildant ar pakeičiant vieną arba kelias serino ar treonino liekanas natyvaus *mpl* ligando sekoje (O glikozilinimas). *Mpl*
15 ligando amino rūgščių liekanų seka yra pakeičiama, padarant pakeitimus DNR lygyje, dažniausiai atliekant mutagenezę DNR, koduojančios *mpl* ligando polipeptidą, pakeičiant kodonus taip, kad jie transliuotų norimas amino rūgščių liekanas. DNR mutacija (mutacijos) gali
20 būti atliktos, naudojant metodus, aprašytus aukščiau, skyriuje "*mpl* ligando amino rūgščių liekanų sekos variantai".

Angliavandenių liekanų skaičiaus padidinimą *mpl* ligando polipeptide galima atlikti taip pat ir fermentiniu ar cheminiu būdais. Šie metodai patogūs tuo, kad
25 tada nereikia polipeptido ekspresiją atlikti sudėtingesnėse ląstelėse, kuriose vyksta N ir O glikozilinimas. Priklausomai nuo naudojamo metodo, angliavandenis (angliavandeniai) gali būti prijungti prie (a)
30 arginino ir histidino, (b) prie laisvų karboksilinių grupių, (c) prie laisvų sulfhidrilo grupių tokių, kaip cisteino, (d) laisvų hidroksilo grupių tokių, kaip serino, treonino ar hidroksiprolino, (e) prie aromatinių liekanų tokių, kaip fenilalanino, tirozino ar
35 triptofano ar (f) prie amidinių glutamino grupių. Šie metodai aprašyti WC 87/05330, publikuotame 1987.09.11.

ir Aplin ir Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 [1981].

Angliavandenių, esančių *mpl* ligando polipeptido grandinėje, pašalinimą galima atlikti cheminiu ar fermentiniu būdais. Deglikozilinant cheminiu būdu, polipeptidas paveikiamas trifluormetansulfo rūgštimi ar ekvivalenčiu junginiu. Šiuo būdu yra pašalinamos dauguma ar visos angliavandenių liekanos, išskyrus jungiančius angliavandenius (N-acetilgliukozaminą ar N-acetilgalaktozaminą), išlaikant nepažeistą polipeptidą. Cheminis deglikozilinimas aprašytas Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **259**:52 [1987] ir Edge et al., *Anal. Biochem.*, **118**:131 [1981]. Fermentinis angliavandenių pašalinimas nuo polipeptidų grandinių gali būti atliekamas įvairiomis endo- ir egzoglikozidazėmis, kaip aprašyta Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, **138**:350 [1987].

Glikozilinimas potencialioje glikozilavimo vietoje gali būti blokuojamas, naudojant tunikamiciną, kaip aprašyta Duskin et al., *J. Biol. Chem.*, **257**:3105 [1982]. Tunikamicinas blokuoja baltymo ir N-glikozido ryšio susidarymą.

Kitas *mpl* ligando modifikavimo tipas apima prijungimą prie *mpl* ligando kurį nors iš daugelio nebaltyminių polimerų, pvz., polietilenglikolį, polipropilenglikolį ar polioksialkiloną, būdu, pateiktu JAV patentuose: Nr. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 ir 4179337. Kovalentiškai modifikuoti šiais polimerais *mpl* ligando polipeptidai šiame išradime vadinami sukabintais ("pegylated") *mpl* ligando polipeptidais.

Suprantama, kad turi būti atliekamas išskirto *mpl* ligando varianto atrinkimas pagal jo sąveiką su *mpl*, o atrinktas *mpl* ligando variantas turi pasižymėti imunobiologiniu ir/arba biologiniu aktyvumu, kaip aprašyta aukščiau. *mpl* ligando variantas gali būti atrenkamas

pagal stabilumą rekombinantinėje ląstelų kultūroje ar plazmoje (pvz., atsparumas proteolizei), pagal afiniškumą *mpl* nariui, pagal atsparumą oksidacijai, pagal produkcijos lygį ir kitas savybes. Pavyzdžiui, imunologinių *mpl* ligando polipeptido savybių, tokių kaip afiniškumas pasirinktiems antikūnams, pakeitimai gali būti įvertinami konkurentine imunoanalize. Kitos baltymų ar polipeptidų savybių modifikacijos, tokios, kaip atsparumas redukcijos-oksidacijos procesams, terminis atsparumas, hidrofobiškumas ar atsparumas proteolizei, gali būti įvertinamos gerai žinomais metodais.

17. Antikūnų prieš *mpl* ligandą gavimas:

bendrieji metodai

Antikūnų gavimas

(i) Polikloniniai antikūnai

Polikloniniai antikūnai prieš *mpl* ligandą arba jo fragmentus paprastai yra gaunami, gyvūnams po oda (sc) arba į pilvo ertmę (ip) keletą kartų suleidžiant *mpl* ligandą kartu su adjuvantu. Geriausia konjuguoti *mpl* ligandą arba jo fragmentą, kuriame yra reikalinga amino rūgščių seka (seka-taikinys), su tokiu baltymu, kuris yra imunogeniškas imunizuojamam gyvūnui, pvz., moliuskų hemocianinu, serumo albuminu, jaučio tiroglobulinu arba sojos pupelių tripsino inhibitoriumi, naudojant difunkcinį arba modifikuojantį agentą, pavyzdžiui, maleinimidobenzoil-sulfosukcinimido esterį (prijungimas per cisteino liekaną), N-hidroksisukcinimidą (per lizino liekaną), glutaro aldehidą, sukcinio anhidridą, SOCl_2 , arba $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, kur R ir R^1 yra skirtingos alkilo grupės.

Imunizuojant *mpl* ligandu ar jo fragmentais, gyvūnams keliose vietose po odą suleidžiama nuo 1 mg iki 1 μg (triušiams arba pelėms, atitinkamai) peptido arba konjugato, suspenduoto 3 tūriuose pilno Freund'o adju-

vanto. Po mėnesio gyvūnams keliose vietose po oda suleidžiama nuo 1/5 iki 1/10 peptido arba konjugato pradinio kiekio, suspenduoto pilname Freund'o adjuvante. Po 7-14 dienų iš gyvūnų paimamas kraujas ir serume
5 nustatomas antikūnų prieš *mpl* ligandą titras. Gyvūnai pakartotinai imunizuojami tol, kol pasiekiamas pakankamai aukštas titras. Tikslinga pakartotinai imunizuoti gyvūnus to paties ligando konjugatu, bet konjugavimui naudoti kitą baltymą arba kitą konjugavimo agentą.
10 Agreguojantys agentai, tokie kaip aliuminis, naudojami imuninio atsako sustiprinimui.

(ii) Monokloniniai antikūnai

Monokloniniai antikūnai yra išskiriami iš homogeniškų antikūnų populiacijos, t.y., individualūs antikūnai yra visiškai identiškai visai populiacijai, išskyrus retai pasitaikančias mutantines molekules, kurios gali atsirasti dėl natūraliai vykstančių mutacijų. Taigi, terminas "monokloniniai" rodo, kad antikūnai
20 nėra skirtingų antikūnų mišinys.

Pavyzdžiui, šiame išradime aprašyti monokloniniai antikūnai prieš *mpl* ligandą gali būti gauti hibridominės technologijos būdu pagal Kohler'io ir Milstein'o metodą (*Nature*, **256**:495, 1975), arba rekombinantinės
25 DNR metodais (JAV patentas Nr.4816567, Cabilly ir kt.).

Naudojant hibridominės technologijos metodą, pelė arba kitas tinkamas gyvūnas, pavyzdžiui, žiurkėnas, yra imunizuojamas aukščiau aprašytu būdu, kad limfocitai pradėtų produkuoti specifinius antikūnus prieš imunizacijai naudotą baltymą. Yra ir alternatyvus limfocitų
30 *in vitro* imunizacijos būdas. Po to limfocitai suliejami su mielomos ląstelėmis, naudojant tinkama suliejimo agentą, pavyzdžiui, polietilenglikolį, kad susiformuotų hibridominė ląstelė (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, Academic Press, 1986).
35

Tokiu būdu gautos hibridominės ląstelės išsėjamos ir auginamos tinkamoje terpėje, kurioje yra viena arba keletas medžiagų, inhibuojančių nehibridinių, tėvinių mielomos ląstelių augimą. Pavyzdžiui, jeigu tėvinės
5 mielomos ląstelės neturi fermento hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferazės (HGPRT arba HPRT), hibridomų auginimo terpėje paprastai turi būti hipoksantino, aminopterino ir timidino (HAT terpė), kurie sustabdo HGPRT neturinčių ląstelių augimą.

10 Paprastai pasirenkamos tokios mielomos ląstelės, kurios efektyviai hibridizuojasi, užtikrina stabilia antikūnų ekspresiją po suliejimo su atitinkama anti-kūnus produkuojančia ląstele, o taip pat yra jautrios tam tikrai terpei, pavyzdžiui, HAT terpei. Iš tokių
15 mielomos ląstelių linijų dažniausiai pasirenkamos pelės mielomos ląstelių linijos, tokios kaip MOPC-21 ir MPC-11 (Salk Institute Distribution Center (Salk'o ląstelių centras), San Diego, Kalifornija, JAV) bei SP-2 ląstelės (American Type Culture Collection, Rockville, Merilendas, JAV). Taip pat yra aprašytos žmogaus mielo-
20 mos bei pelės-žmogaus heteromielomos ląstelių linijos, kurios gali būti panaudotos žmogaus monokloninių antikūnų gavimui (Kozbor, J.Immunol., 133:3001 [1984]; Brodeur ir kt., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Markel Dekker, Inc.,
25 New York, 1987).

Terpėje, kurioje auga hibridomos, yra tikrinama monokloninių antikūnų prieš *mpl* ligandą produkcija. Paprastai monokloninių antikūnų specifiškumas tikri-
30 namas imuniprecipitacijos būdu arba *in vitro* metodais, tokiais kaip radioimuninis metodas (RIA) arba imunofermentinis metodas (ELISA).

Monokloninių antikūnų afiniškumas (saveikos tvirtumas) gali būti vertintas Scatchard'o analizės
35 pagalba pagal Munson ir Polard, *Anal. Biochem.*, 107:220 [1980].

Nustačius, kad hibridominės ląstelės produkuoja norimo specifiškumo ir afiniškumo antikūnus, pradiniai klonai yra subklonuojami didėjančių praskiedimų metodu ir auginami kaip įprasta (Goding, žr aukščiau). Šiam tikslui tinka tokios terpės, kaip DMEM arba RPMI-1640. Be to, hibridomos gali būti auginamos *in vivo*, kaip gyvūno ascitinis auglys.

Subklonų produkuojami monokloniniai antikūnai paprastai išskiriami iš terpės, ascitinio skysčio arba serumo, naudojant įprastas imunoglobulinų gryninimo procedūras, pavyzdžiui, chromatografiją ant baltymo A-Sepharozės arba hidroksilapatito, elektroforezę gelyje, dializę arba afininę chromatografiją.

Šiame išradime aprašytus monokloninius antikūnus koduojanti DNR yra išskirta ir sekvenuota, naudojant įprastas procedūras (t.y., naudojant oligonukleotidų sekas, kurios specifiškai sąveikauja su genų, koduojančių pelės antikūnų lengvasias ir sunkiasias grandines, sekomis). Ši DNR paprastai išskiriama iš hibridominių ląstelių. Išskirta DNR gali būti perkelta į ekspresijos vektorius, kurie po to tranfekuojami į ląstelę-šeimininką, pavyzdžiui, į beždžionių COS ląsteles, žiurkėnių kiaušidžių ląsteles (CHO) arba į neprodukuojančias imunoglobulinų mielomos ląsteles, tokiu būdu užtikrinant monokloninių antikūnų sintezę rekombinantinėje ląstelėje-šeimininke. DNR taip pat gali būti modifikuojama, pavyzdžiui, žmogaus sunkiųjų ir lengvųjų grandinių pastoviuosius domenus koduojančiomis DNR sekomis pakeičiamos homologiškos pelės DNR sekos (Cabilly ir kt, žr. aukščiau, Morrison ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 81:6851 [1984]), arba prie imunoglobulinus koduojančios DNR sekos kovalentiškai prijungiama kitoki polipeptidą koduojanti seka arba jos dalis.

Pakeitus tokį ne imunoglobulininės kilmės baltymą šiame išradime aprašytų antikūnų pastoviuoju domenu, arba šių antikūnų antigeną jungiančiosios vietos

kintamuoju domenu, sukuriami bivalentiniai chimeriniai antikūnai, kuriuose yra dvi antigeną jungiančiosios vietos - viena specifiška *mpl* ligandui, kita specifiška kitam antigenui.

5 Chimeriniai arba hibridiniai antikūnai taip pat gali būti gaunami *in vitro*, naudojant gerai žinomus baltymų cheminės sintezės metodus arba prijungimo agentus. Pavyzdžiui, galima sukonstruoti imunotoksinus, naudojant disulfidų mainų reakciją arba įvedant tio-
10 eterinį ryšį. Šiam tikslui tinka tokie reagentai, kaip iminotiolatas ir metil-4-merkaptobutirimidatas.

Norint pritaikyti aprašytus antikūnus diagnostiniams tikslams, reikia pažymėti vieną iš komponentų. Šis komponentas turi tiesiogiai ar netiesiogiai sukelti
15 signalą, kurį galima išmatuoti. Pavyzdžiui, tokia žymė gali būti radioizotopas, toks kaip ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S arba ^{125}I , fluorescuojantis arba chemiliuminescuojantis junginys, toks kaip fluoresceino izotiocianatas, rodaminas arba liuciferinas, o taip pat fermentai, tokie kaip
20 šarminė fosfatazė, beta-galaktozidazė arba krienų peroksidazė.

Šiam tikslui gali būti panaudotas bet kuris žinomas antikūnų žymėjimo metodas, pavyzdžiui, metodai, aprašyti Hunter ir kt., *Nature*, **144**:945 [1962], David
25 ir kt., *Biochemistry*, **13**:1014 [1974]; Pain ir kt., *J. Immun. Meth.*, **40**:219 [1981], Nygren, J. *Hystochem. and Cytochem.*, **30**:407 [1982].

Šiame išradime aprašyti antikūnai gali būti panaudoti bet kokiam žinomam analizės metodui, pavyzdžiui,
30 konkurenciniam analizės metodui, tiesioginei ir netiesioginei dviepitopinei analizei, o taip pat imunoprecipitacijai (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc., 1987).

Konkurentiniai analizės metodai remiasi tuo, kad
35 žymėtas standartas (tai gali būti *mpl* ligandas arba

imunologiškai aktyvus jo fragmentas) konkuruoja su testuojamajame pavyzdyje esančiu *mpl* ligandu dėl sąveikos su antikūnais. *mpl* ligando kiekis testuojamajame pavyzdyje yra atvirkščiai proporcingas standarto, prisijungusio prie antikūnų, kiekiui. Kad būtų galima nustatyti, kiek standarto prisijungė prie antikūnų, paprastai antikūnai yra imobilizuojami arba išsodinami – tokiu būdu yra atskiriami prisijungę ir neprisijungę prie antikūnų standartas bei analizuojamasis ligandas.

10 Dviepitopinėje analizėje yra naudojami dveji antikūnai, kurių kiekvienas atpažįsta skirtingas analizuojamojo baltymo (*mpl* ligando) imunogeniškas sekas, arba epitopus. Dviepitopinėje analizėje antigenas sąveikauja su pirmaisiais antikūnais, imobilizuotais
15 kietoje fazėje, o po to antrieji antikūnai prisijungia prie antigeno, tokiu būdu sudarydami netirpų trijų komponentų kompleksą (David ir Green, JAV patentas Nr. 4376110). Antrieji antikūnai gali būti žymėti (tiesioginė dviepitopinė analizė), arba jų kiekis išmatuojamas, naudojant žymėtus anti-imunoglobulininius anti-
20 kūnus (netiesioginė dviepitopinė analizė). Pavyzdžiui, viena iš dviepitopinės analizės modifikacijų yra imunofermentinė analizė, kai naudojama fermentinė žymė (pvz., krienų peroksidazė).

25

(iii) *Humanizuoti ir žmogaus antikūnai.*

Garai žinomi metodai, kurių pagalba ne žmogaus kilmės antikūnai gali būti humanizuojami. Paprastai humanizuotuose antikūnuose yra įterpta viena arba daugiau ne žmogaus kilmės amino rūgščių liekanų. Šios ne žmogaus kilmės amino rūgščių liekanos dažnai vadinamos "pernešimo" liekanomis ir paprastai yra paimamos iš "pernešamo" kintamojo domeno. Humanizaciją galima atlikti metodais, pasiūlytais Winter ir kt. (Jones ir
30 kt., *Nature*, **321**:522:525 [1986]; Riechmann ir kt., *Nature*, **332**:323-327 [1988]; Verhoeyen ir kt., *Science*,

239:1534-1536 [1988]), pakeičiant graužikų CDR sekas atitinkamomis žmogaus antikūnų sekomis. Atitinkamai, tokie "humanizuoti" antikūnai vadinami chimeriniais (Cagilly *et al.*, *supra*), jeigu juose žymiai mažiau nei
5 intaktinis kintamasis domenas (t.y., ne visas domenas) yra pakeičiamas atitinkama ne žmogaus kilmės amino rūgščių seka. Praktiškai, humanizuoti antikūnai yra tipiškai žmogaus antikūnai, kuriuose kai kurios CDR, o kartais ir kai kurios FR amino rūgščių liekanos pakeistos analogiškomis graužikų antikūnų sekomis.
10

Siekiant sumažinti imunogeniškumą, labai svarbu pasirinkti žmogaus imunoglobulinų sunkiųjų ir lengvųjų grandinių kintamuosius domenus, tinkamus humanizuotų antikūnų gavimui. Tam gali būti naudojamas "geriausio atitikimo" metodas, kai graužikų antikūnų kintamojo domeno seka yra palyginama su visų žinomų žmogaus imunoglobulinų kintamųjų domenų sekų biblioteka. Ta žmogaus imunoglobulinų seka, kuri labiausiai panaši į graužikų imunoglobulinų seką, pasirenkama kaip karkasas
20 (framework, FR) humanizuotiems antikūnams gauti (Sims ir kt., *J. Immunol.*, **151**:2296 [1993]; Chothia ir Lesk, *J. Mol. Biol.*, **196**:901 [1987]). Naudojant kitą metodą, pasirenkamas tam tikras karkasas, gautas iš bendros (konsensinės) visiems žmogaus antikūnams amino rūgščių sekos, kuri sudaro tam tikrą lengvųjų ir sunkiųjų grandinių pogrupį. Tas pats karkasas gali būti naudojamas keliems skirtingiems humanizuotiems antikūnams gauti (Carter ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4285 [1992]; Presta ir kt., *J. Immunol.*, **151**:2623
25 [1993]).
30

Taip pat labai svarbu, kad atlikus antikūnų humanizaciją būtų išsaugotas jų aukštas afiniškumas ir kitos svarbios biologinės savybės. Siekiant šio tikslo, pasirenkamas toks metodas, kai humanizuotų antikūnų
35 ruošimo metu yra analizuojamos pradinės sekos ir

- įvairūs humanizuoti produktai, naudojant pradinių ir humanizuotų sekų erdvinės struktūros modelius. Imunoglobulinų erdvinės struktūros modeliai yra visiems prieinami ir gerai žinomi šios srities specialistams.
- 5 Sukurtos kompiuterinės programos, kurios iliustruoja ir pademonstruoja tam tikros pasirinktos imunoglobulinų sekos galimas erdvinės konformacijos struktūras. Analizuojant šiuos modelius, galima įvertinti tam tikrų amino rūgščių liekanų reikšmę tiriamos imunoglobulinų
- 10 sekos funkcijoms, t.y., galima analizuoti amino rūgščių liekanas, kurios yra svarbios tiriamos imunoglobulinų sekos sąveikai su antigenu. Tokiu būdu, galima pasirinkti tokias FR sekas ir tokias "pernešimo" sekas, kad antikūnams būtų suteiktos tam tikros reikalingos savybės, pavyzdžiui, didelis afiniškumas antigenui. Apskritai, CDR sekos turi tiesioginę įtaką sąveikai su anti-
- 15 genu (JAV paraiška išradimui Nr.07/934373, pateikta 1992.08.21., kuri yra paraiškos Nr. 07/715272, pateiktos 1991.06.14., tęsinys).
- 20 Kita vertus, šiuo metu galima gauti transgeninius gyvūnus (pvz., peles), kuriuose po imunizacijos susidaro vien tik žmogaus antikūnai ir visai nevyksta endogeninių imunoglobulinų sintezė. Pavyzdžiui, buvo aprašyta, kad homozigotinė delecija antikūnų sunkiosios
- 25 grandinės sujungimo srities genų (J_H) srityje visiškai inhibuoja endogeninių antikūnų produkciją chimerinėse ir mutantinėse pelėse, turinčiose mutaciją nepertvarkytame imunoglobulinų gene (germ-line mutant). Kai į tokią mutantinę pelę perkeliamas nepertvarkytas žmogaus
- 30 imunoglobulinų genas, po stimuliacijos antigenu prasižieda žmogaus imunoglobulinų sintezė (Jakobovits ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255 [1993]; Jakobovits ir kt., *Nature*, 362:255-258 [1993]; Bruggermann ir kt., *Year in Immuno.*, 7:33 [1993]).
- 35 Žmogaus antikūnai taip pat gali būti gaunami fagu bibliotekų pagalba (Hoogenboom ir Winter, *J. Mol.*

Biol., 227, 381, [1991]; Marks ir kt., *J. Mol. Biol.*, 222, 581 [1991]).

(iv) *Bispecifiniai antikūnai*

5 Bispecifiniai antikūnai yra monokloniniai antikūnai, paprastai žmogaus arba humanizuoti antikūnai, kurie yra specifiški mažiausiai dviems skirtingiems antigenams. Yra žinomi bispecifinių antikūnų gavimo metodai.

10 Tradiciškai, rekombinantiniai bispecifiniai antikūnai gaunami, atliekant dviejų imunoglobulinų lengvųjų grandinių-sunkiųjų grandinių porų ko-ekspresiją, kai abi sunkiosios grandinės turi skirtingą specifiškumą (Milstein ir Cuello, *Nature*, 305:537-539 [1983]). Dėl
15 imunoglobulinų lengvųjų ir sunkiųjų grandinių įvairovės tokios hibridomos (kvadromos) produkuoja 10 skirtingų antikūnų molekulių mišinį, kurių tik viena turi teisingą bispecifinę struktūrą. Šių teisingos struktūros antikūnų išvalymas (tam paprastai naudojama afininė
20 chromatografija), yra gana sudėtingas, o išeigos mažos. Panašios procedūros aprašytos PCT publikacijoje WO 93/08829 (publikuota 1993.05.13.), o taip pat Trauhecker ir kt., *EMBO*, 10:3655-3659 [1991].

Yra ir kitas, tinkamesnis būdas, kai reikiamo specifiškumo kintamieji domenai (antikūno-antigeno sąveikos sritys) yra sujungiami su imunoglobulinų pastoviuju domenu sekomis. Paprastai tokiame junginiui naudojamas sunkiosios grandinės pastovusis domenas, kuriame turi būti bent dalys šarnyrinės (hinge), CH2 ir CH3 sričių.
25 Be to, bent viename iš junginių turėtų būti ir pirmojo sunkiosios grandinės domeno (CH1) dalis, kurioje yra sritis, būtina lengvosios grandinės prisijungimui. DNR, koduojanti imunoglobulinų sunkiosios grandinės junginius ir, jeigu reikia, imunoglobulinų lengvąją grandinę, yra įterpiama į skirtingus ekspresijos vektorius ir
30 vienu metu transfekuojama į tinkamą ląstelę-šeimininką.

Transfekuotose ląstelėse stebima didelė galimų kombina-
cijų įvairovė, skirtingomis tarpusavio proporcijomis
susirenkant šiems trims polipeptidiniams fragmentams,
kadangi esant šių trijų polipeptidinių grandinių tam
5 tikram nevienodam santykiui užtikrinama optimali
išeiga. Tačiau įmanoma dvi ar visas tris polipeptidinių
grandinių koduojančias DNR sekas įterpti į vieną eks-
presijos vektorių, kai siekiama didelės bent dviejų
polipeptidinių grandinių ekspresijos, esant vienodam jų
10 santykiui, arba kai šios proporcijos neturi didelės
reikšmės. Pasirenkant šį būdą, bispecifiniai antikūnai
yra sukonstruojami iš hibridinės imunoglobulinų sunkio-
sios grandinės, turinčios vienokį specifiškumą, ir iš
hibridinės imunoglobulinų sunkiosios grandinės - leng-
15 vosios grandinės poros, turinčios kitokį specifiškumą.
Buvo nustatyta, kad tokia asimetrinę struktūrą, turin-
čią bispecifinį komponentą, lengviau atskirti nuo kitų
nereikalingų imunoglobulinų grandinių kombinacijų,
kadangi imunoglobulinų lengvasias grandines turi tik
20 pusė bispecifinių molekulių. Šis būdas aprašytas parai-
škoje išradimui Nr.07/931811, pateiktoje 1992.08.17.

Detaliau bispecifinių antikūnų gavimo metodai
aprašyti Suresh ir kt., *Methods in Enzymol.*, 121:210
[1986].

25

(v) *Heterokonjuguoti antikūnai*

Heterokonjuguoti antikūnai taip pat yra šio išra-
dimo dalis. Heterokonjuguoti antikūnai yra sukompo-
nuojami iš dviejų kovalentiškai sujungtų antikūnų.
30 Tokie antikūnai buvo sukurti tam, kad, pavyzdžiui, būtų
galima nukreipti imuninės sistemos ląsteles atakuoti
nepageidautinas ląsteles (JAV patentas Nr. 4676980),
arba kad būtų galima gydyti ŽIV infekciją (PST publi-
kacija WO 91/00360 ir WO 92/00373, EP 03089). Hetero-
35 konjuguotus antikūnus galima sukonstruoti, naudojant
bet kokį įprastą konjugavimo metodą. Tinkami prijungimo

agentai yra gerai žinomi ir aprašyti JAV patente Nr. 4676980, kartu pateikiant ir keletą konjugavimo metodų.

5 **IV. Megakariocitopoetinio baltymo - *mpl* ligando - panaudojimas terapijoje.**

Biologiškai aktyvus *mpl* ligandas, atliekantis hematopoetinio efektoriaus funkciją ir aprašytas čia kaip megakariocitopoetinis arba trombocitopoetinis
10 baltymas (TPO), steriliai paruošus jo vaistinę formą, gali būti naudojamas megakariocitopoetinės arba trombocitopoetinės funkcijos stimuliavimui, gydant trombocitopeniją, atsiradusią dėl susilpnėjusios trombocitų
15 produkcijos arba jų destruktijos. Kaulų čiulpų hipoplazija, susijusi su trombocitopenija (pvz., aplastinė anemija po chemoterapijos arba kaulų čiulpų persodinimo), o taip pat ir kiti susirgimai, tokie kaip išsėtinė intravaskulinė koaguliacija (DIC), imuninė trombocitopenija (tarp jų ŽIV sukelta ITP arba ne ŽIV
20 sukelta ITP), chroniška idiopatinė trombocitopenija, kongenitalinė trombocitopenija, mielodisplazija ir trombotinė trombocitopenija, gali būti efektyviai gydomi šiame išradime aprašytais komponentais. Be to, šie megakariocitopoetiniai baltymai gali būti panau-
25 dojami, gydant mieloproliferacines ligas, o taip pat trombocitozes, atsiradusias dėl uždegimų arba geležies trūkumo.

Tiksliausia šiame išradime aprašytą megakariocitopoetinį arba trombocitopoetinį baltymą (TPO) naudoti mielotoksinei chemoterapijai, gydant leukemiją
30 arba kietus auglius, mieloabliatyvinei terapijai autologinės arba alogeninės kaulų čiulpų transplantacijos atveju, o taip pat mielodisplazijos, idiopatinės aplastinės anemijos, kongenitalinės trombocitopenijos bei
35 imuninės trombocitopenijos atvejais.

Kiti susirgimai, kurie gali būti sėkmingai gydomi šiame išradime aprašytu megakariocitopoetiniu baltymu, yra trombocitų defektai arba pažeidimai, atsiradę dėl vaistų ar nuodų poveikio arba aktyvacijos, vykstant
5 sąveikai su dirbtiniu paviršiumi. Šiais atvejais minėtas baltymas gali būti naudojamas stimuliuoti naujų, nepažeistų trombocitų atsparumą. Visas galimų pritaikymo variantų sąrašas pateiktas Šio išradimo esmės aprašyme, o ypač jo (a)-(f) dalyse ir ten cituojamuose
10 šaltiniuose.

Megakariocitopoetiniai baltymai, aprašyti šiame išradime, gali būti naudojami vieni arba kombinuojant juos su kitais citokinais, hemopoetiniais, interleukinais, augimo faktoriais arba antikūnais, gydant
15 minėtus susirgimus. Taigi, šie aprašyti komponentai gali būti naudojami kartu su kitais trombopoetinį aktyvumą turinčiais baltymais arba peptidais, tarp jų G-CSF, GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-1, IL-3, eritropoetinu (EPO), kit-ligandu, IL-6 ir IL-11.

20 Megakariocitopoetiniai baltymai, aprašyti šiame išradime, sumaišomi su nešikliais, tinkančiais vaistinių preparatų gamybai. Tokia vaistinė forma gali būti naudojama intraveninėms injekcijoms arba inhaliacijoms per nosį arba plaučius. Ši vaistinė forma taip pat gali
25 būti suleidžiama po oda arba parenteraliniu būdu. Paruoštas nuolatiniam vartojimui, šis preparatas turi būti nepirogeniškas, ištirpintas tinkamame injekcijoms tirpale su atitinkamu pH, tam tikro izotoniškumo bei stabilumo. Šios sąlygos gerai žinomos šios srities spe-
30 cialistams. Trumpai tariant, šiame išradime aprašytų komponentų vaistinės formos yra paruošiamos vartojimui arba saugojimui, į atitinkamai išgrynintus komponentus pridėdant fiziologiškai priimtinių nešiklių arba stabilizatorių. Šios medžiagos yra netoksiškos, vartojant
35 jas reikiamomis dozėmis, o į jų sudėtį įeina buferinių tirpalų komponentai, tokie kaip fosfatai, citratai,

acetatai arba kitokios organinių rūgščių druskos; anti-
oksidantai, tokie kaip askorbino rūgštis; mažo molekulinio svorio (mažiau nei 10 amino rūgščių liekanų) peptidai, tokie kaip poliargininas; baltymai, tokie kaip
5 serumo albuminas, želatina arba imunoglobulinai; hidrofiliiniai polimerai, tokie kaip polivinilpirolidinas; amino rūgštys, tokios kaip glicinas, gliutamatas, aspartatas, argininas; monosacharidai, disacharidai ir kiti angliavandeniai, tarp jų celiuliozė arba jos dariniai, gliukozė, manozė arba dekstrinai; chelatiniai agentai, tokie kaip EDTA; sacharidai, tokie kaip manitas arba sorbitas, jonai, tokie kaip natrio jonai, ir/arba nejoninės paviršiaus aktyvios medžiagos, tokios kaip Tween, Puronics arba polietilenglikolis.

15 Apie 0,5-500 mg megakariocitopoetinio baltymo arba šių baltymų mišinio (tai gali būti jų rūgštinė, šarminė forma arba vaistinei formai tinkama druska) sumaišoma su fiziologiškai priimtiniu nešikliu, užpildu, stabilizatoriumi, konservantu ir t.t., kaip įprasta vaistų gamybos praktikoje. Aktyvaus komponento kiekis turi atitikti reikiamą dozę.

Sterilūs tirpalai injekcijoms paruošiami taip, kaip įprasta farmacijos praktikoje. Pavyzdžiui, aktyvusis komponentas ištirpinamas arba suspenduojamas
25 vandenyje arba natūraliame augaliniame aliejuje, pavyzdžiui, sezamo, riešutų arba medvilnės sėklų aliejuje arba sintetinėse riebiosiose rūgštyse, tokiose, kaip etilo oleatas ar panašiose. Buferinės medžiagos, konservantai, antioksidantai ir kt., gali būti irgi
30 pridedami, kaip įprasta farmacinėje praktikoje.

Kad būtų palaikoma pastovi preparato koncentracija, naudojamos pusiau pralaidžios matricos iš kietų hidrofobinių polimerų, kurie suformuoja mikrokapsules su ten esančiu polipeptidu. Tokių pusiau pralaidžių
35 membranų pavyzdžiai gali būti poliesteriai, hidrogeliai (pvz., poli(2-hidroksietimetakrilatas), kaip aprašyta

Langer ir kt., *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**:167-277 [1981] ir Langer, *Chem. Tech.*, **12**:98-105 [1982] arba polivinilalkoholis), o taip pat poliaktidai (JAV patentas Nr. 3773919, EP 58481), L-gliutamino rūgšties ir
5 gama-etil-L-gliutamato kopolimerai (Sidman ir kt., *Biopolymers*, **22**:547-556 [1983]), nesuyrantis etilenvinilacetatas (Langer ir kt., *supra*), suyrantys pieno rūgšties-glikolio rūgšties kopolimerai, tokie kaip Lupron DepotTM (mikro-rutuliukai iš pieno rūgšties-
10 glikolio rūgšties kopolimero ir leuprolido acetato), ir poli-D-(-)-3-hidroksibutiro rūgšties (EP 133988).

Jeigu polimerai, tokie kaip etilenvinilacetatas ir pieno rūgšties-glikolio rūgšties kopolimerai, gali atpalaiduoti baltymo molekules daugiau kaip 100 dienų,
15 kai kurie hidrogeliai atpalaiduoja baltymus trumpesni laiką. Kai baltymas, uždarytas į kapsulę, išbūna organizme ilgą laiką, jis gali denatūruoti arba agreguoti, veikiamas drėgmės 37°C temperatūroje, ir dėl to gali netekti biologinio aktyvumo arba gali pasikeisti jo
20 imunogeninės savybės. Priklausomai nuo šių pokyčių mechanizmo turi būti pasirenkama baltymo stabilizavimo strategija. Pavyzdžiui, jeigu vyksta agregacija dėl tarpmolekulinio S-S-ryšio susiformavimo, stabilizacija galima atlikti, modifikuojant sulfhidrilines liekanas,
25 liofilizuojant preparatą iš rūgštaus tirpalo, kontroliuojant drėgmę, naudojant tam tikrus priedus ir kuriant specifines polimerinių matricų kompozicijas.

Norint palaikyti pastovią megakariocitopoetinio baltymo koncentraciją, taip pat galima naudoti liposomose "uždarytą" megakariocitopoetinį baltymą. Liposomos su jose "uždarytu" megakariocitopoetiniu baltymu paruošiamos šiais metodais: DE 3218121; Epstei ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:3688-3692 [1985]; Hwang ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4030-4034 [1980];
35 EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641;

paraiška Japonijos patentui 83-118008; JAV patentai Nr. 4485045 ir 4544545 ir EP 102324. Paprastai liposomos yra mažos (apie 200-800 Å), vienasluoksnės, ir jų sudėtyje būna daugiau nei 30 mol. procentų cholestero-

5 lio - tikslesnės proporcijos pasirenkamos taip, kad būtų optimalus megakariocitopoetinio baltymo terapinis efektas.

Dozę turi nustatyti gydantis gydytojas, atsižvelgdamas į įvairius faktorius, galinčius turėti įtakos

10 vaistų veikimui - ligos ūmumą ir tipą, kūno svorį, lytį, dietos laikymąsi, injekcijų laiką ir dažnį, kitų medikamentų vartojimą, o taip pat ir kitus klinikinius faktorius. Paprastai dienos norma yra 0,1-100 µg/kg kūno svorio. Optimali dozė yra 0,1-50 µg/kg kūno

15 svorio. Optimaliausia pradinė dozė yra 1-5 µg/kg per dieną. Dozės yra panašios kaip ir kitiems citokinams, ypač G-CSF, GM-CSF, ir EPO. Terapiškai efektyvios dozės gali būti nustatomos *in vitro* arba *in vivo* metodais.

20

PAVYZDŽIAI

Tikimasi, kad šio aprašymo ir iliustracijų pakankama tam, kad bet kuris specialistas išsamiai atkartotų šį išradimą. Pateikiami darbiniai pavyzdžiai atskleidžia optimalius išradimo variantus, bet neapriboja

25 išradimo.

PAVYZDYS 1

Dalinai išgrynintas kiaulės *mpl* ligandas

Surenkama normalių ar kiaulių su aplastine anemija

30 trombocitais neturtinga plazma. Kiaulių plazma padaroma aplastine, kiaules apšvitinant 900 cGy visam svoriui, spinduliavimo šaltiniu naudojamas 4 mEV linijinis greitintuvas. Apšvitintoms kiaulėms atliekamas cefazolino injekcijos į raumenis 6 - 8 dienas. Po to visas jų

35 kraujas surenkamas, esant pinai anestezijai, pridedama

heparino ir centrifuguojama, esant 1800g, 30 minučių; taip gaunama plazma be trombocitų. Megakariocitus stimuliuojančio aktyvumo maksimumas būna po 6 dienų po apšvitinimo.

5 Į aplastinę kiaulių plazmą, gautą iš apšvitintų kiaulių, pridedama iki 4M NaCl ir maišoma 30 min. kambario temperatūroje. Gautos nuosėdos pašalinamos centrifūguojant (3800 aps/min) centrifūgoje Sorvall RC3B, supernatantas užnešamas ant kolonos su Phenyl-Toyopearl (220 ml), nulygsvarintos 10mM Na fosfatiniu buferiniu tirpalu, į kurią pridėta iki 4M NaCl. Kolona praplaunama tuo pačiu buferiniu tirpalu, kol A_{280} tampa mažesnis, nei 0,05, baltymai eliujuojami dH_2O . Elijuotų baltymų piko frakcija praskiedžiama dH_2O iki 15 mS
10 laidumo ir užnešamas ant Blue-Sepharose kolonėlės (240 ml), nulygsvarintos PBS. Kolonėlė praplaunama penkiais kolonos tūriais PBS ir penkiais kolonos tūriais 10mM (pH 7,4) Na fosfatiniu buferiniu tirpalu, į kurią pridėta 2 M karbamido. Baltymai eliujuojami 10 mM
15 (pH 7.4) natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu, į kurią pridėta 2M urėjos ir 1M NaCl. Į apjungtas eliuoto baltymo frakcijas pridedama 0,01% oktilglukozido (n-oktil- β -D-gliukopiranozido) ir po 1mM EDTA ir Pefabloc (Boe-
hinger Mannheim) ir sorbuojama ant tandemiškai sujungto
20 CD4-IgG (Capton, D. J. et al., *Nature*, **337**:525-531 [1989]) ir mPl-IgG Ultralink (Pierce) kolonėlių (žiūr. žemiau). CD4-IgG (2 ml) kolonėlė pašalinama, kai mėginys užnešamas ir mPl-IgG (4 ml) kolonėlė praplaunama po 10 kolonėlės tūrių PBS ir PBS su 2 M NaCl, ir sorbuoti
25 baltymai eliujuojami su 0,1 M glicino-HCl tirpalu, pH 2,25. Frakcijos surenkamos į 1/10 frakcijos tūrio 1 M Tris-HCl buferinį tirpalą (pH 8,0).

Elijuotos frakcijos analizuojamos SDS PAGE (4-20%, Novex gel) redukuojančiose sąlygose (Fig. 5).
35 Išryškintų sidabru baltymų intensyvios juostos atitinka

66000, 55000, 30000, 28000 ir 14000 molekulinės masės. Tam, kad būtų galima nustatyti, kurie baltymai stimuliuoja Ba/F3-*mpl* ląstelių kultūrą, šie baltymai buvo eliujuoti iš SDS PAGE gelio, kaip aprašyta
5 Pavyzdyje 2.

Ultralink afininė kolonėlė

10-20 mg *mpl*-IgG ar CD4-IgG PBS tirpale buvo prisiuvama prie 0,5 g Ultralink sorbento (Pierce) pagal gamintojo aprašymą.

10 *mpl*-IgG konstravimas ir ekspresija

Chimerinė molekulė, kurioje yra visas ekstraląstelinis žmogaus *mpl* domenas (amino rūgščių liekanos 1-491) ir žmogaus IgG1 molekulės F_c regionas, ekspresuojama 293 ląstelių linijoje. kDNR fragmentas, koduojantis žmogaus *mpl* amino rūgščių liekanas nuo 1 iki 491,
15 gaunamas iš žmogaus megakariocitų CMK ląstelių kDNR bibliotekos panaudojus PCR, ir po to sekvenuojamas. *Cla*I skėlimo sritis buvo prijungiama 5' gale, *Bst*EII skėlimo sritis - 3' gale. Šis fragmentas buvo klonuojamas prieš IgG1 F_c koduojantį regioną į Bluescript vektorių tarp *Cla*I ir *Bst*EII skėlimo sričių po dalinio PCR produkto suskaldymo su *Bst*EII, nes dvi kitos *Bst*EII skėlimo vietos yra koduojančioje ekstraląstelinėje *mpl* domena DNR. *Bst*EII skėlimo vieta buvo įvedama į *mpl* PCR produkto 3' galą, tam, kad F_c sritis būtų tame pačiame
20 rėmelyje kartu su *mpl* ekstraląstelinio domenu. Ši konstrukcija buvo subklonuota į pRK5-tkneo vektorių tarp *Cla*I ir *Xba*I skėlimo sričių ir transfekuota į žmogaus embrioninių inkstų ląstelių 293 liniją kalcio fosfatiniu metodu. Ląstelės buvo auginamos selektyvioje terpėje su 0,4 mg/ml G418 ir išaugę individualūs klonai buvo atskiriami. *mpl*-IgG ekspresija atskirtuose klonuose buvo nustatyta naudojant žmogaus F_c specifinę ELISA. Geriausiai besiekspresuojantis klonas produkavo 1 -
25 2 mg/ml *mpl*-IgG.
35

Ba/F3 mpl P ekspresuojančios ląstelės

kDNR, atitinkanti visą žmogaus *mpl* P koduojančią sritį, buvo klonuota į pRK5-tkneo vektorių, kuris buvo vėliau linearizuotas *NotI* ir transfekuotas į IL-3 priklausomų Ba/F3 ląstelių liniją elektroporacijos būdu (1×10⁷ ląstelių, 9605F, 250 V). Po trijų dienų buvo pradėta transfekantų atranka, naudojant 2 mg/ml G418. Ląstelės buvo atrinktos bendrai arba klonuotos limituojančių skiedimų metodu 96 šulinėlių plokštelėse. Atrinktos ląstelės auginamos RPMI terpėje su 15 % FBS, 1 mg/ml G418, 20 mM glutamino, 10 mM HEPES ir 100 µg/ml Pen-Strep. *mpl* P ekspresija atrinktuose klonuose buvo nustatyta FACS analize, naudojant polikloninius triušio anti-*mpl* P antikūnus.

Ba/F3 mpl ligando nustatymas

mpl ligando nustatymas pavaizduotas Fig. 2. *mpl* ligando nustatymui iš įvairių šaltinių *mpl* P Ba/F3 ląstelės buvo auginamos be IL-3 24 valandas, esant 5×10⁵ ląstelių viename ml inkubatoriuje, prisotintame vandens garais, 37°C temperatūroje, paduodant orą su 5% CO₂. Po auginimo be IL-3 ląstelės buvo perkeliamos į 96 šulinėlių plokšteles, esant 50000 ląstelių 200 µl terpės, pridedama arba nepridedama praskiestų mėginių ir kultivuojama 24 valandas CO₂-inkubatoriuje. 20 µl beseruminės RPMI terpės, kurioje yra 1 µCi ³H-timidino, buvo pridedama į kiekvieną šulinėlį ir laikoma 6-8 valandas. Ląstelės buvo surenkamos ant 96 šulinėlių GF/C filtro plokštelių ir praplaunamos 5 kartus vandeniu. Radioaktyvumas buvo įvertintas pridėjus 40 µl scinciliacinio skysčio (Microscint 20) Packard Top Count skaitikliu.

PAVYZDYS 2

Išgrynintas kiaulės *mpl* ligandas*Gel-filtracija*

Vienodi afiniškai išgryninto *mpl* ligando (6
5 frakcija eliujuota nuo *mpl*-IgG kolonėlės) ir 2 kartus
sukoncentruoto Laemmli pavyzdžio buferinio tirpalo
tūriai buvo sumaišomi kambario temperatūroje be
redukuojančio agento ir nedelsiant užnešami ant Novex
4-20 % poliakrilamidinio gelio. Mėginys nebuvo
10 kaitinamas. Kontrole buvo naudojamas pavyzdžio
buferinis tirpalas be ligando. Elektroforezė buvo
vykdoma 4-6°C temperatūroje, esant 135 V įtampai,
maždaug 2¼ valandas. Elektroforetinis buferinis
tirpalas elektroforezės pradžioje buvo kambario
15 temperatūros. Gelis buvo išimamas iš elektroforezės
aparato ir nuo gelio nuimama viena plokštelė.

Gelio replika buvo padaroma ant nitroceliuliozės
tokiu būdu: gabalėlis nitroceliuliozės membranos buvo
sudrėkinamas distiliuotu vandeniu ir atsargiai užde-
20 damas ant gelio viršaus taip, kad po membrana neliktų
oro burbulėlių. Nitroceliuliozinė membrana ir gelis
pažymimi kad nudažytą membraną būtų galima vėl tiksliai
uždėti ant gelio. Maždaug po 2 minučių nitroceliuliozinė
membrana buvo atsargiai nuimama, gelis įdedamas į
25 plastikinį maišelį ir padedamas į šaldytuvą. Nitroce-
liuliozinė membrana buvo ryškinama Bio-Rad baltymų
dažymo auksu reagentų rinkiniu, pirmiausia purtant
membraną tris kartus po 10 ml 0,1 % Tween 20 +0,5 M
NaCl +0,1 M Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 7,5)
30 apytikriai po 45 minutes, po to tris kartus praplaunama
10 ml distiliuoto vandens po 5 minutes. Dažymo auksu
mišinys buvo užpilamas ir paliekama ryškintis, kol
standartinių baltymų juostos tampa matomos. Gelio
replika po to praplaunama vandeniu, uždedama, sutapa-
35 tinus žymes, ant maišelyje suvynioto poliakrilamidinio

gelio. Novex standartinių baltymų juostų pozicijos buvo pažymėtos ant gelio ir nubrėžiamos gelio pjaustymo linijos. Nitroceliuliozinė membrana ir plastikinis maišelis nuo gelio nuimami, gelis supjaustomas pagal
5 pažymėtas linijas aštriu peiliuku. Pjuviai padaromi kiek ilgesni nei mėginių takelių plotis, kad nudažius likusiąją gelio dalį, būtų galima tiksliai nustatyti išpjautos juostelės poziciją. Kai supjaustyto gelio gabaliukai nuimami, likusi gelio dalis nudažoma
10 sidabru, ir pamatuojamos supjaustymo linijų ir standartinių baltymų atstumai nuo starto pozicijos. Pagal Novex standartus nustatomos išpjautų gelio juostelių pozicijas atitinkančios molekulinės masės.

Dvylika gelio gabalėlių buvo įdedama į dviejų Bio-
15 Rad 422 modelio elektroliutorio kiuvetes. Kiuvetėse buvo naudojami membraniniai kamštukai su 12-14 kD pralaidumu. Elektroeliucijai buvo naudojamas eliucijos buferinis tirpalas: 50mM amonio bikarbonato + 0,05 % SDS (pH apie 7,8). Prieš naudojimą vienas litras šio
20 buferinio tirpalo buvo vieną valandą išlaikomas 4-6°C temperatūroje. Eliucija buvo vykdoma šaltame kambaryje, esant 10 mA srovei vienai kiuvetei (pradinė įtampa - 40 V) ir palaikant 4-6°C temperatūrą. Elektroeliucija trukdavo apie 4 valandas. Kiuvetės atsargiai buvo iš-
25 imamos ir viršuje esantis tirpalas buvo nusiurbiamas pipete. Eliucijos kamera buvo išimama ir tirpalas, esantis membranos dangtelyje buvo nusiurbiamas Pipetmanu ir saugomas. Po 50 µl išgryninto vandens buvo įpilama į membranų dangtelius, supurtoma, kol visi SDS
30 kristalai ištirps. Šie tirpalai buvo prijungiami prie pirmųjų tirpalų. Bendri eliucijos tirpalų tūriai buvo po 300 - 500µl vienam gelio gabalėliui. Mėginiai buvo dializuojami supylus į 10mm Spectrapor 4 dializės žarnes, kurių pralaidumas - 12 - 14 kD, prieš išgrynintą
35 vandenį kelias valandas. Po to mėginiai buvo dializuojami per naktį 4-6°C temperatūroje prieš 600 ml (6 mė-

giniams) fosfatinio buferinio fiziologinio tirpalo (PBS yra apytikriai 4 mM kalio). Buferinis tirpalas buvo pakeičiamas kita ryta ir dar dializuojama 2,5 valandos. Mėginiai buvo išimami iš dializės maišelių ir supilami
5 į mikrocentrifuginius mėgintuvėlius. Mėginiai buvo išlaikomi vieną valandą lede, po to centrifuguojami, esant 14000 aps/min, 4 minutes. Supernatantai buvo praskiedžiami PBS ir juose buvo nustatomas *mpl* ligando aktyvumas. Likę mėginiai buvo užšaldomi -70°C temperatūroje.
10

PAVYZDYS 3

*Kiaulės *mpl* ligando mikrosekvenavimas*

Šešta nuo *mpl*-IgG afininės kolonėlės frakcija
15 (2,6 ml) buvo koncentruojama Microcon-10 kiuvetėje (Amicon). Tam, kad būtų išvengta *mpl* ligando sorbcijos Microcon kiuvetėje, membrana buvo praplaunama 1 % SDS tirpalu ir pridedama 5μl 10% SDS tirpalo į 6 frakcijos mėginį. Pavyzdžio buferinis tirpalas, du kartus sukonzentruotas (20 μl), buvo įpilamas į 6 frakcijos Microcon koncentratą (20 μl) ir bendras (40 μl) mišinys buvo užnešamas į vieną 4-20 % gradientinio poliakrilamidinio gelio (Novex) takelį. Elektroforezė buvo atliekama pagal Novex aprašymą. Prieš elektroblotingą gelis buvo
20 nulygsvarinamas 5 minutes 10 mM 3-(cikloheksilamino)-1-propansulfo rūgšties (CAPS) buferiniame tirpale, pH 11,0, kuriame buvo 10% metanolio. Elektroblotingas buvo vykdomas 45 minutes su Immobilon-PSQ membranomis (Millipore), esant 250mA pastoviai srovei Bio-Rad Trans-
25 Blot pernešimo kiuvetėje (32). PVDF membrana buvo ryškinama su 0,1% Coomassie Blue 40% metanolio, 0,1% acto rūgšties tirpale 1 minutę, blukinamas 2-3 minutes 10% acto rūgšties ir 50% metanolio tirpale. Vieninteliai matomi baltymai 18000 - 35000 D molekulinės masės srityje buvo 30000, 28000 ir 22000 D molekulinės masės.
30
35

- 30, 28 ir 22 kD molekulinės masės juostos buvo naudojamos baltymų sekvenavimui. Automatinis baltymų sekvenavimas buvo atliekamas 470A modelio Applied Biosystem sekvenatoriumi su sujungtu PTH analizatoriumi.
- 5 Sekvenatorius buvo modifikuotas taip, kad būtų galima naudoti 80-90% mėginio (Rodriguez, *J. Chromatogr.*, **350**: 217-225 [1985]). Į tirpiklį A buvo pridedama acetono (~12 µl/l) UV detekcijos subalansavimui. Baltymai po elektroblotavimo buvo sekvenuojami Blott strypuose.
- 10 Eliucijos pikai buvo integruojami naudojant Justice Innovation duomenų apdorojimo programą ir Nelson Analytical 970 keitiklį. Sekų analizė buvo atliekama naudojant VAX 5900 (Henzel et al., *J. Chromatogr.*, **404**:41-52 [1987]). Baltymų N galo amino rūgščių liekanų sekos
- 15 (naudojant vienos raidės kodus, abejotinas amino rūgščių liekanas pažymint skliausteliuose) ir gautos medžiagos kiekiai (laužtiniuose skliausteliuose) pateikti Lentelėje 2'.

Lentelė 2'

20 *mpl ligando N galo amino rūgščių liekanų sekos*

30 kD		[1.8 pmol]				
1	5	10	15	20	25	
(S) PAPP(A) DPRLNKLRRDD(H/S) VLH(G) RL						(SEQ ID Nr.: 30)
28 kD		[0,5 pmol]				
1	5	10	15	20	25	
(S) PAPPAXDPRLNKLRRDD(H) VL(H) GR						(SEQ ID Nr.: 31)
18-22 kD		[0,5 pmol]				
1	5	10				
XPAPPAXDPR LX(N) (K)						(SEQ ID Nr.: 32)

PAVYZDYS 4

25 *Megakariocitopoezės suspensinėje ląstelių kultūroje tyrimas*

Žmogaus periferinės kamieninės ląstelės (PSC) (išskirtos iš savanorių pacientų) buvo atskiestos 5 kartus IMDM terpėje (Gibco) ir centrifuguotos 15 min. kambario temperatūroje 800xg. Ląstelės buvo suspen-

duotos IMDM, užneštos ant 60% Percoll'o (1,077 g/ml tankio) (Pharmacia) ir centrifuguotos 800xg 30 min. Mažo tankio mononuklearinės ląstelės, sukonzentruotos tarp skirtingo tankio sluoksnių, buvo nusiurbtos, 5 praplautos 2x IMDM terpe, suspenduotos ($1-2 \times 10^6$ ląstelių/ml) IMDM terpėje su 30% FBS ir išpilstytos po 1 ml į 24 šulinėlių plokštelę audinių kultūrai (Costar). APP arba APP be *mpl* ligando buvo pridėta iki 10% ir kultūros buvo auginamos 12-14 dienų 37°C temperatū- 10 roje inkubatoriuje, prisotintame vandens garų ir 5% CO₂. Kultūros taip pat buvo auginamos su 10% APP ir 0,5 µg *mpl*-IgG, kurie buvo pridėti 0, 2 ir 4 dieną. APP buvo atskirta nuo *mpl* ligando, praleidžiant per *mpl*-IgG afininę kolonėlę.

15 Megakariocitopoezės įvertinimui šiose suspensinėse kultūrose buvo naudojama Solberg et al. metodo modifikacija, panaudojant radioaktyviu izotopu žymėtus pelės IgG monokloninius antikūnus (HP1-1D) prieš GPIIb/IIIa (gautus iš Dr. Nichols'o, Mayo klinika). 100µg HP1-1D 20 (žiūr. Grant, B. et al., *Blood* **69**:1334-1339 [1987]) buvo žymėta 1mCi Na¹²⁵J naudojant Enzymobeads (Biorad, Richmond, CA) pagal gamintojo instrukcijas. Žymėtas HP1-1D buvo laikomas PBS su 0,01% oktil-gliukozido. Tipiškas specifinis radioaktyvumas buvo $1-2 \times 10^6$ cpm/µg 25 (>95% po precipitacijos 12,5% trichloracto rūgštimi).

Kiekvienas eksperimento taškas suspensinėje kultūroje buvo nustatinėjamas trimis pakartojimais. Po 12-14 dienų kultivavimo po 1 ml ląstelių suspensijos buvo pernešama į 1,5 ml Ependorf mėgintuvėlius ir centrifū- 30 guojama 10 min. 800xg kambario temperatūroje. Gautos ląstelių nuosėdos buvo suspenduojamos 100 µl PBS su 0,02% EDTA ir 20% veršiuko serumo. 10 ng ¹²⁵I-HP1-1D, ištirpinto 50 µl analizės buferinio tirpalo, buvo pridedama prie suspenduotų ląstelių ir inkubuojama

60 min. kambario temperatūroje (KT), retkarčiais supur-
tant. Po to ląstelės buvo nusodinamos, centrifuguojant
10 min. 800xg KT ir praplaunamos 2x analizės buferiniu
tirpalu. Ląstelių nuosėdų radioaktyvumas buvo matuo-
5 jamas 1 min. gama skaitiklyje (Pacard). Nespecifinė są-
veika buvo nustatoma, pridedant 1 µg nežymėto HP1-1D,
60 min. prieš įdedant žymėto HP1-1D. Specifinė sąveika
buvo nustatoma kaip skirtumas tarp viso prisijungusio
¹²⁵J-HP1-1D radioaktyvumo ir radioaktyvumo, esant nežy-
10 mėto HP1-1D pertekliui.

Pavyzdys 5

Oligonukleotidiniai PCR pradmenys

Pagal 30 kD, 28 kD ir 18-22 kD baltymų N galo
15 amino rūgščių liekanų sekas buvo susintetinti išsigimę
oligonukleotidų pradmenys polimerazinei grandininei
reakcijai (PCR) (žiūr. Lentelę 4). Buvo susintetinti
dviejų tipų išsigimę pradmenys: teigiamas 20 nukleotidų
pradmuo, koduojantis 2-8 amino rūgščių liekanas (*mpl* 1)
20 ir antisensinis 21 nukleotido pradmuo, komplementarus
18-24 amino rūgščių liekanas koduojančiai sekai
(*mpl* 2).

Lentelė 4

Išsigimusių oligonukleotidų pradmenys

mpl 1: 5' CNN GCN CCN CCN GCN TGY GA 3'
(2048 - išsigimimo laipsnis) (SEQ ID Nr.: 35)
mpl 2: 5' NCC RTG NAR NAC RTG RTC RTC 3'
(2048 - išsigimimo laipsnis) (SEQ ID Nr.: 36)

25

Kiaulės genomine DNR, išskirta iš periferinio
kraujo limfocitų, buvo naudojama kaip matrica PCR.
50 µl reakcijos mišinyje buvo: 0,8µg kiaulės genominės
DNR 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) tirpale, 50 mM KCl, 3 mM
30 MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 400 µM dNTP, po 1 µM kiekvieno
išsigimusio pradmens ir 2,5 vieneto *Tag* polimerazės.
Pradinis matricos denatūravimas buvo atliekamas 94°C

temperatūroje 8 minutes, po to sekė 35 ciklai išlaikymo po 45 sekundes 94°C, 1 min. 55°C ir 1 min. 72°C temperatūrose. Paskutinis ciklas buvo iki 10 min. 72°C temperatūroje PCR produktai buvo atskiriami elektroforeze 12% poliakrilamidiniame gelyje ir vizualizuojami su etidžio bromidu. Buvo tikimasi, kad, jei amino rūgščių liekanų seka baltymo N gale koduojama vienu egzonu, tai taisytinas PCR produktas turi būti 69 bazių porų (bp) ilgio. Tokio dydžio DNR fragmentas buvo eliujuotas iš gelio ir subklonuotas į vektorių pGEMT (Promega). Trijų klonų sekos yra pateiktos žemiau Lentelėje 5.

Lentelė 5.

69bp kiaulės genominės DNR fragmentai

gemT3

5'CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA
3'GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGGAGCACT

TGACCACGTT CAGCACGGC [69bp] (SEQ ID Nr.: 37)
ACTGGTGCAA GTCGTGCCG (SEQ ID Nr.: 38)

gemT7

5'CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA
3'GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTTATTTG ACGAAGCACT

CGACCACGTC CATCACGGC [69bp] (SEQ ID Nr.: 39)
GCTGGTGCA GTAGTGCCG (SEQ ID Nr.: 40)

gemT9

P R L L N K L L R (SEQ ID Nr.: 32)

5'CCAGCACCGCCGGCATGTGACCCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACG
3'GGTCGTGGCGGCCGTACACTGGGGGCTGAGGATTTATTTGACGAAGCACTGC

ATCATGTCTATCACGGT 3' (SEQ ID Nr.: 41)
TAGTACAGATAGTGCCA 5' (SEQ ID Nr.: 42)

15

PCR pradmenų pozicijos pavaizduotos pabraukiant bazes. Gauti rezultatai atitinka 30 kD, 28 kD ir 18-22 kD baltymų N gale esančia amino rūgščių liekanų seka nuo 9 iki 17 amino rūgščių liekanos, ir tai patvirtina, kad šios sekos yra koduojamos vienu kiaulės DNR egzonu.

20

PAVYZDYS 6

Žmogaus mpl ligando genas

Remiantis duomenimis, pateiktais Pavyzdyje 5, genominės bibliotekos analizei buvo sukonstruotas ir
5 susintetintas 45 monomerų dezoksioligonukleotidas, pavadintas pR45. Jo seka:

5'GCC GTG AAG GAC GTG GTC GTC ACG AAG CAG TTT ATT
TAG GAG TCG 3' (SEQ ID Nr.: 28)

Šis oligonukleotidas, pažymėtas ^{32}P naudojant
10 ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP ir T4 kinazę, buvo naudojamas žmogaus geno-
minės DNR bibliotekos, esančios λgeml2 , analizei ne-
griežtose hibridizacijos ir atplovimo sąlygose (žiūr.
Pavyzdį 7). Teigiami klonai buvo surenkami, išgryninami
ir analizuojami restikcijos ir Southern blotingo
15 pagalba. Klonas Nr. 4 buvo atrinktas tolesnei analizei.

2,8 kb BamHI-XbaI fragmentas, kuris hibridizavosi
su pR45, buvo subklonuotas į pBluescript SK- vektorių.
Dalinis šio klono DNR sekvenavimas buvo atliktas naudo-
jant pradmenis, specifinius kiaulės *mpl* ligando DNR
20 sekai. Nustatyta seka patvirtino, kad išskirta DNR
koduoja žmogaus *mpl* ligandą, homologišką kiaulės *mpl*
ligandui. Nustatyta EcoI restriktazės skėlimo vieta
sekoje leido išskirti 390 bp EcoRI-XbaI fragmentą iš
2,8 kbp BamHI-XbaI fragmento ir subklonuoti šį frag-
25 mentą į pBluescript SK-.

Abi šio fragmento grandinės buvo sekvenuotos. Žmo-
gaus DNR seka ir išvestinė amino rūgščių liekanų seka
yra pateiktos Fig. 9 (SEQ ID Nr: 3 ir 4), galimos
intronų vietos genomineje sekoje taip pat pažymėtos
30 rodyklėmis ir nurodytas spėjamas egzonus ("egzonus 3").

Analizuojant išvestinę amino rūgščių liekanų seka,
buvo patvirtinta, kad serinas yra pirma amino rūgščių
liekana subrendusio *mpl* ligando sekoje, tai taip pat
buvo nustatyta sekvenuojant amino rūgščių liekanų seka.
35 Labai tikėtina, kad prieš pat šį kodoną (Ser) yra sig-

nalinė seka, dalyvaujanti subrendusio *mpl* ligando sekrecijoje. Ši signalinė seka, matyt, yra pertraukta ties 68 nukleotidu intronu.

Panašu, kad 3' kryptimi egzonas baigiasi ties 196
5 nukleotidu. Šis egzonas koduoja 42 amino rūgščių liekanų seka, 16 iš kurių, matyt, yra dalis signalinės sekos, o 26 - subrendusio žmogaus *mpl* ligando.

PAVYZDYS 7

10 *Visa žmogaus mpl ligando kDNR*

Remiantis žmogaus "egzono 3" seka (Pavyzdys 6) buvo susintetinti du neišsigimę oligonukleotidai, atitinkantys 3' ir 5' "egzono 3" galams (Lentelė 6)

15 **LENTELĖ 6**

Žmogaus kDNR neišsigimę PCR oligonukleotidų pradmenys

Tiesioginis pradmuo 5' GCT AGC TCT AGA AAT TGC TCC TCG TGG TCA TGC TTG T 3'	(SEQ ID Nr.: 43)
Atvirkštinis pradmuo 5' CAG TCT GCC GTG AAG GAC ATG G 3'	(SEQ ID Nr.: 44)

Šie du pradmenys buvo naudojami PCR reakcijoje,
20 naudojant kaip matricą DNR iš įvairių žmogaus kDNR bibliotekų arba 1 ng Qiuck Clone kDNR (Clonotech) iš įvairių audinių. Reakcijos sąlygos aprašytos Pavyzdyje 5. Laukiamas taisyklingo PCR produkto dydis turėjo būti 140 bp. Po PCR produktų analizės 12 % poliakrilamidiniame gelyje tokio dydžio fragmentas buvo aptiktas
25 kDNR bibliotekose, išskirtose iš suaugusiųjų inkstų ir iš embrioninių inkstų ląstelių linijos 293, o taip pat kDNR, paruoštoje iš žmogaus embrioninių kepenų (Clonotech cat. Nr. 7171-1).

30 Embrioninių kepenų kDNR biblioteka, klonuota λDR2 (Clonotech cat. Nr. HL1151x), buvo analizuojama su ta pačia 45 oligonukleotidų seka, kuri buvo naudojama

analizuojant žmogaus genominę biblioteką. Olikonukleotidas buvo pažymėtas su ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP, naudojant T4 polinukleotidkinazę. Biblioteka buvo analizuojama švelnėmis hibridizacijos sąlygomis. Filtrai buvo prehibridizuojami 2 valandas, po to hibridizuojami su mėginiais per naktį (16 val.) 42°C temperatūroje 20% formamide, 5xSSC, 10x Denhardto buferiniame tirpale, 0,05M natrio fosfatiname tirpale (pH 6,5), 0,1% natrio pirofosfato tirpale, pridėjus 50 µg/ml ultragarsu paveiktos lašišų spermos DNR. Filtrai buvo pamerkiami į 2xSSC ir vieną kartą praplaunami 0,5xSSC, 0,1% SDS 42°C temperatūroje. Filtrai buvo laikomi per naktį ant Kodak X-Ray fotojuostos. Teigiami klonai buvo surenkami, gryninami, ir įterptos sekos dydis buvo nustatomas PCR, klonuojant BamHI-XbaI flankuojančius oligonukleotidus į λDR2 (Clonotech Cat. Nr. 6475-1). 5 µl fago suspensijos buvo naudojama kaip matricos šaltinis. Pradinė denatūracija buvo atliekama 94°C temperatūroje 7 minutes, po kurios sekė 30 amplifikacijos ciklą (1 min. 94°C, 1 min 52°C ir 1,5 min. 52°C) Pabaigoje buvo išlaikoma 15 min. 72°C temperatūroje. Klonas Nr. FL2b turėjo 1,8 kbp tarpą ir buvo atrinktas tolesnei analizei.

Plazmidė pDR2 (Clonotech, λDR2 & pDR2 Cloning and Expresion system Library Protocol Handbook, p. 42), kurioje yra λDR2 fago rankos, buvo sukarpomą, kaip aprašyta gamintojo instrukcijose (Clonotech, λDR2 & pDR2 Cloning and Expresion system Library Protocol Handbook, p. 29-30). Plazmidės pDR2-FL2b restrikcinė analizė su BamHI ir XbaI parodė, kad yra intarpe vidinė BamHI skėlimo vieta, apytikriai 650 pozicijoje. Skal- dant plazmidę BamHI-XbaI, intarpas sukarpomą į du fragmentus, vienas yra 0,65 kbp, kitas - 1,15 kbp. DNR seka buvo nustatoma su trimis skirtingų klasių matri- comis, gautomis iš plazmidės pDR2-FL2b. Dvigrandės plazmidinės DNR sekos analizė buvo atliekama ABI373

modelio automatinio fluorescentinio DNR sekvenatoriumi (Applied Biosystems, Foster City, California) pagal standartinį analizės protokolą dažų žymėtiems didezoksinukleozidtrifosfatų terminatoriams (spalviniai terminatoriai) ir įprastus šokinėjančius pradmenis (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467 [1977]; Smith et al., *Nature*, **321**:674-679 [1986]). Polimerazinės grandininės reakcijos ampifikacijos būdu gautų plazmidės fragmentų tiesioginis sekvenavimas buvo atliekamas ABI373 sekvenatoriumi, naudojant įprastinius pradmenis ir spalvinius terminatorius. Viengrandė matrica buvo gauta naudojant M13 Janus vektorių (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) (Burland et al., *Nucl. Acids Res.*, **21**:3385-3390 [1993]). BamHI-XbaI (1,15 kbp) ir BamHI (0,65 kbp) fragmentai buvo išskirti iš plzmidės pDR2-FL2b, galai buvo užpildomi su T4 DNR polimeraze, esant reakcijos mišinyje dezoksinukleotidams, ir subklonuojami į SmaI skėlimo vietą vektoriuje M13 Janus. Sekvenavimas buvo atliekamas pagal standartinį protokolą, naudojant dažų žymėtus M13 universalius ir atvirkštinius pradmenis, arba šokinėjančius pradmenis ir spalvinius terminatorius. Neautomatinis sekvenavimas buvo atliekamas su viengrande M13 DNR, naudojant šokinėjančius pradmenis ir standartinį didezoksiterminavimo metodą (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5463-5467 [1977]), naudojant ^{33}P žymėtus α -dATP ir Sekvenazę (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). DNR sekvenatorius buvo valdomas Sequencher V2.1b12 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Žmogaus ML nukleotidų ir išvestinės amino rūgščių liekanų sekos pateiktos Fig. 1 (SEQ ID Nr.:1).

PAVYZDYS 8

Žmogaus mpl ligando (TPO) geno išskyrimas

Žmogaus genominės DNR TPO geno klonai buvo
5 išskirti atliekant žmogaus genominės bibliotekos,
esančios λ -Gem12, analizę, panaudojant anksčiau
aprašytą oligonukleotidu pR45 švelniomis sąlygomis (žiūr.
Pavyzdį 7) arba labai griežtomis sąlygomis, naudojant
fragmentą, atitinkantį kDNR, koduojančio žmogaus *mpl*
10 ligandą, 3' dalį (nuo BamHI skėlimo vietos iki 3'
galo). Buvo išskirti du persidengiantys 35 kbp lambda
klonai. Buvo subklonuoti ir sekvenuoti du persiden-
giantys fragmentai (BamHI ir EcoRI), kuriuose yra
pilnas TPO genas. Žmogaus geno 7 kbp ilgio genominėje
15 DNR yra 6 egzonai (Fig. 14A, B ir C). Prie visų
egzonų/intronų ribų yra konsensinis motyvas, būdingas
žinduolių genams (Shapiro, M. B., et al., *Nucl. Acids*
Res., 15:7155 [1987]). Egzone 1 ir egzone 2 yra 5'
netransliuojamos sekos ir pirmąsias 4 signalinio
20 polipeptido amino rūgščių liekanas koduojantys nukleo-
tidai. Likusi sekretorinio signalo dalis ir pirmosios
subrendusio baltymo 26 amino rūgščių liekanos koduo-
jamos egzono 3 viduje. Visas C galo domeną ir 3' ne-
transliuojamas galas, o taip pat į eritropoetiną pana-
šaus domeno apie 50 amino rūgščių liekanų yra koduojama
25 egzono 6 viduje. Keturios amino rūgščių liekanos,
kurios pašalinamos, kaip pastebėta hML-2 (hTPO-2)
baltymui, yra koduojamos 6 egzono 5' gale.

30

PAVYZDYS 9

Žmogaus mpl ligando (hML) laikinoji ekspresija

Siekiant subklonuoti pilno ilgio intarpą, esantį
pDR2-FL2b plazmidėje, pastaroji buvo visiškai suskal-
dyta restriktaze XbaI, o po to ne visiškai suskaldyta
35 restrikcijos endonukleaze BamHI. DNR fragmentas, ati-

tinkantis 1,8 kbp ilgio intarpą, buvo išgrynintas elektroforetiškai agaroziniame gelyje ir subklonuotas pRK5 plazmidėje (pRK5-hmpl I) (pRK5 konstravimas pateiktas JAV patente Nr. 5258287) funkcionaliai sujungiant intarpą su aktyviausiuoju citomegalo viruso promotoriumi. DNR iš konstrukto pRK5-hmpl I buvo išskirta PEG metodu ir transfekuota į žmogaus embriono inkstų ląstelių liniją 293, auginamą Dulbecco modifikuotuoju Eagle terpėje (DMEM) su šiais priedais: mitybinis mišinys F-12, 20 mM HEPES (pH 7,4) ir 10 % embrioninio galvijų serumu. Ląstelės buvo transfekuotos kalcio fosfatiniu metodu, kaip aprašyta (Gorman, C. [1985] in *DNR Cloning: A Practical Approach* (Glover, D. M., ed.) Vol. II, pp. 143-190, IRL Press, Washington, D.C.). Po 36 valandų transfekuotų ląstelių supernatantų aktyvumai buvo analizuojami proliferacijos metodu (žiūr. Pavyzdį 1). 293 linijos ląstelių, transfekuotų vien pRK vektoriumi, supernatantai nestimuliuodavo nei Ba/F3, nei Ba/F3-mpl ląstelių proliferacijos (Fig. 12A). Ląstelių, transfekuotų pRK5-hmplI plazmide, supernatantai neveikė Ba/F3 ląstelių, bet stipriai stimuliuodavo Ba/F3-mpl ląstelių proliferaciją (Fig. 12A). Tai įrodo, kad ši kDNR koduoja funkcionaliai aktyvų žmogaus mpl ligandą.

25

PAVYZDYS 10

Žmogaus mpl ligando izoformas hML2, hML3 ir hML4

Siekiant nustatyti alternatyvias hML formas, buvo susintetinti pradmenys, atitinkantys kiekvieną seką, koduojančios hML, galą. Šie pradmenys buvo panaudoti RT-PCR amplifikuojant suaugusio žmogaus kepenų RNR. Papildomai buvo sukonstruoti ir panaudoti vidiniai pradmenys, flankuojantys pasirinktus regionus (žiūr. žemiau). Tiesioginis PCR produkto galų sekvenavimas parodė, kad yra viena seka, atitinkanti kDNR, išskirtos

35

iš žmogaus embrioninių kepenų bibliotekos, seką (žiūr. Fig. 1 [SEQ ID Nr.:1]). Tačiau pagal seką, esančią prie EPO domeno C galo (PCR produkto viduryje), struktūra buvo galima spręsti apie galimus spaisingo variantus, esančius šioje srityje. Kad būtų galima išskirti šiuos spaisingo variantus, suaugusio žmogaus kepenų kDNR buvo analizuojama PCR, naudojant minėtą sritį flankuojančius pradmenis, kurių sekos pateiktos Lentelėje 7.

LENTELĖ 7

10 Žmogaus ML izoformų PCR pradmenys

phmpllcdna.3e1:

5'TGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATG 3' (SEQ ID Nr.:45)

pbx4.f2:

5'GGTCCAGGGACCTGGAGGTTTG 3' (SEQ ID Nr.:46)

PCR produktai buvo subklonuoti į M13. Individualių subklonų sekvenavimas parodė, kad egzistuoja mažiausiai trys ML izoformos. Viena iš jų, hML (taip pat žymima kaip hML₃₃₂), yra ilgiausia forma ir atitinka seką, išskirtą iš embrioninių kepenų bibliotekos. Keturios žmogaus *mpl* ligando izoformų sekos, pradedant nuo ilgiausios (hML) ir baigiant trumpiausia (hML-4), yra pateiktos Fig. 11 (SEQ ID Nr.: 6, 8, 9, ir 10).

20

PAVYZDYS 11

Žmogaus Mpl ligando izoformų ir pakeistų variantų hML2, hML3 ir hML(R153A, R154A) konstravimas ir tarpinė ekspresija

25 Izoformos hML2, hML3 ir pakeisti variantai hML(R153A, R154A) buvo konstruojami iš hML, naudojant rekombinantinę PCR techniką, aprašytą Russell Higuchi, in PCR Protocols, A guide to Methods and Applications, Acad. Press, M.A.Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White Editors.

30

Visų konstrukcijų "išoriniai" pradmenys yra pateikti Lentelėje 8, "persidengiantys" pradmenys pateikti Lentelėje 9.

LENTELE 8

Išoriniai pradmenys

Cla.FL.F2:

5'ATC GATATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G3' (SEQ ID Nr.:47)

HMPLL-R:

5'GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC
ATG AGA 3' (SEQ ID Nr.:48)

LENTELE 9

Persidengiantys pradmenys

5

hML-2: MLΔ4F: 5'CTC CTT GGA ACC CAG GGC AGG ACC 3' MLΔ4R: 5'GGT CCT GCC CTG GGT TCC AAG GAG 3'	 (SEQ ID Nr.:49) (SEQ ID Nr.:50)
hML-3: MLΔ116+: 5'CTG CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT 3' MLΔ116-: 5'AAT CCA GAA GTC CTT TCC TCG GAG CAG 3'	 (SEQ ID Nr.:51) (SEQ ID Nr.:52)
hML(R153A, R154A): RR-KO-F: 5'CCC TCT GCG TCG CGG CGG CCC CAC CCA C 3' RR-KO-R: 5'GTG GGT GGG GCC GCC GCG ACG CAG AGG G 3'	 (SEQ ID Nr.:53) (SEQ ID Nr.:54)

Visos PCR amplifikacijos buvo atliktos su klonuota Pfu DNR polimeraze (Stratagene), šiomis sąlygomis: pradinė matricos denatūracija buvo atlikta 94°C temperatūroje 7 min., po to sekė 30 ciklų po 1 min. 94°C, 1 min. 55°C ir 1,5 min. 55°C. Paskutinis ciklas buvo pabaigiamas išlaikant 10 min. 72°C temperatūroje. Galutinis PCR produktas buvo suskaldytas ClaI-XbaI, išrgyntas gelyje ir klonuotas į pRK5tkneo. 293 linijos ląstelės buvo transfekuotos įvairiais konsruktais, kaip aprašyta aukščiau, šių ląstelių supernatantas buvo tiriamas Ba/F3-*mpl* proliferacijos metodu. hML-2 ir hML-3 šiame tyrime neturėjo aktyvumo, hML(R153A, R154A) pasižymėjo panašiu aktyvumu kaip ir hML, tai parodo, kad skėlimas šioje dviejų bazinių amino rūgščių liekanų vietoje neturi įtakos aktyvumui (žiūr. Fig. 13).

PAVYZDYS 12

*Pelės mpl ligando kDNR mML, mML-2 ir mML-3**mML kDNR išskyrimas*

5 DNR fragmentas, atitinkantis visą žmogaus *mpl* ligando koduojamą regioną buvo gautas panaudojant PCR, išgrynintas gelyje ir pažymėtas atsitiktiniais pradmenimis, esant ^{32}P -dATP ir ^{32}P -dCTP. Šis mėginys buvo panaudotas analizuojant 10^6 klonų iš pelės kepenų kDNR
10 bibliotekos, klonuotos λ GT10 (Clontech Cat Nr. ML3001a). Replikos ant filtrų buvo gautos per naktį mėginius hibridizuojant 35 % formamide, 5xSSC, 10xDenharto buferiniame tirpale, 0,1 % SDS, 0,05 M natrio fosfatiname buferiniame tirpale (pH 6.5), 0,1% natrio pirofosfato tirpale, esant 100 $\mu\text{g/ml}$ apdorotos ultragarsu
15 lašišos spermos DNR. Filtrai buvo praplaunami 2xSSC, po to praplaunami vieną kartą 0,5xSCC, 0,1% SDS 42°C temperatūroje. Hibridizacijai naudotas fagas buvo išgrynintas ir kDNR intarpai buvo subklonuoti į Eco RI skėlimo vietą Bluescript SK- plazmidėje. "LD" klonas su
20 1,5 kbp intarpu buvo pasirinktas tolesnei analizei, abi grandinės buvo analizuojamos, kaip aprašyta aukščiau žmogaus ML kDNR atveju. Klono LD nukleotidų ir išvestinės amino rūgščių liekanų sekos yra pateiktos Fig. 14
25 (SEQ ID Nr.: 1 ir 11). Išvestinė subrendusio ML baltymo amino rūgščių liekanų seka iš šio klono yra iš 331 amino rūgščių liekanų ir žymima mML₃₃₁ (ar mML-2 dėl nurodytų žemiau priežasčių). Žymus tiek nukleotidų, tiek ir amino rūgščių liekanų sekų identiškumas buvo
30 nustatytas šių ML į EPO-panašiuose domenuose. Tačiau, kai buvo palygintos žmogaus ir pelių ML išvestinės amino rūgščių liekanų sekos, buvo pastebėta keturių amino rūgščių liekanų (tarp 111 ir 114) delecija, kuri atitiko 12 nukleotidų deleciją (nuo 618 nukleotido),
35 nustatytą tiek žmogaus (žiūr. aukščiau), tiek ir kiau-

lės (žiūr. žemiau) kDNR. Todėl buvo ištirti ir kiti klonai, siekiant nustatyti galimas pelių ML baltymo izoformas. Viename klone "L7", turinčiame 1,4 kbp intarpą su išvestine 335 amino rūgščių liekanų seka, 5 buvo "prarastas" tetrapeptidas LPLQ. Ši forma, matyt, yra visas pelės ML baltymas, ir pažymėtas mML arba mML₃₃₅. mML nukleotidų ir išvestinė amino rūgščių liekanų sekos pateiktos Fig. 16 (SEQ ID Nr.: 12 ir 13). "L2" klonas taip pat buvo išskirtas ir sekvenuotas. 10 Šiame klone buvo 116 nukleotidų delecija taip pat kaip ir hML3 sekoje, todėl buvo pažymėtas mML-3. Šių dviejų izoformų amino rūgščių liekanų sekų palyginimas yra Fig. 16.

Rekombinantinio mML ekspresija

15 Pelės ML ekspresijos vektorius buvo sukonstruotas taip pat kaip ir Pavyzdyje 8. Klonai, pažymėti mML ir mML-2, buvo subklonuoti į pRK5tkneo, žinduolių ekspresijos vektorių, kuris leidžia ekspresuoti baltymus kontruočiuojant ekspresiją CMV promotoriui ir SV40 20 poliadenilacijos signalui. Galutiniai ekspresijos vektoriai, mMLpRKtkneo ir mML2pRKtkneo, buvo laikinai transfekuoti į 293 linijos ląsteles kalcio fosfatiniu metodu. Po transfekcijos terpė buvo kondicionuojama penkias dienas. Ląstelės buvo palaikomos DMEM terpėje su didele gliukozės koncentracija su 10 % embrioninio 25 veršiukų serumo.

*Pelės *mpl* (*mmp1*) ekspresija Ba/F3 ląstelėse.*

Stabili ląstelių linija, ekspresuojanti c-*mpl* buvo gauta transfekuojant *mmp1* pRKtkneo vektoriumi taip pat, 30 kaip ir žmogaus *mpl* atveju, aprašytu Pavyzdyje 1. Trumpai: ekspresijos vektoriumi (20 µg, linijinis), kuriame yra pilna pelės *mpl* koduojanti seka, (Skoda, R. C., et al., EMBO J., 12:2645-2653 [1993]) buvo transfekuojamos ląstelės Ba/F3 elektroporacijos būdu (5×10⁶ 35 ląstelių, 250 V, 960 µF), po to sekė selekcija pagal

atsparumą neomicinui su 2mg/ml G418. *mpl* ekspresija buvo įvertinama tekmės citometrija, naudojant triušio antiserumą prieš pelės *mpl*-IgG. Ba/F3 ląstelės buvo auginamos RPMI 1640 terpėje, kondicionuotoje WEHI-3B
5 ląstelių (kaip IL-3 šaltinio). 293 ląstelių linijos, transfekuotos su *mML* ir *mML-2*, supernatantas buvo analizuojamas su BA/F3 ląstelėmis, transfekuotomis su *mmp1* ir *hmp1*, aprašytu Pavyzdyje 1 būdu.

10

PAVYZDYS 13***Kiaulės *mpl* ligando *kDNR* *pML* ir *pML-2****

Kiaulės ML (*pML*) *kDNR* buvo išskirta naudojant RACE PCR. Trumpai aprašant: oligodT pradmuo ir du specifi-
finiai pradmenys buvo sukonstruoti remiantis kiaulės ML
15 geno egzono seka, koduojančia baltymo, išskirto iš kiaulių aplastinio serumo, N galą. Buvo paruoštos *kDNR* iš aplastinių kiaulių įvairių audinių. 1342 bp *kDNR* PCR produktas buvo aptiktas inkstuose ir subklonuotas. Keletas klonų buvo sekvenuoti ir surasta seka, koduo-
janti subrendusį kiaulės *mpl* ligandą (be pilnos signa-
linės sekos). Buvo nustatyta, kad *kDNR* koduoja 332
20 amino rūgščių liekanų subrendusį baltymą, (*pML*₃₃₂), jo seka pateikta Fig. 18 (SEQ ID Nr.: 9 ir 16).

Medodas:25 ***pML* ir *kDNR* išskyrimas.**

Genominiai kiaulės ML geno klonai buvo išskirti tikrinant kiaulės genominę biblioteką, esančią EMBL3 (Clontech Inc.) su pR45. Biblioteka buvo tikrinama kaip
aprašyta Pavyzdyje 7. Buvo atrinkta keletas klonų ir
30 sekvenuotas egzonas, koduojantis amino rūgščių liekanų seka, identišką ML sekai. Kiaulės *kDNR* buvo gauta, naudojant modifikuotą RACE PCR metodą. Buvo susinte-
tinti du specifiniai ML pradmenys, remiantis kiaulės ML
geno seka. Poliadenilinta iRNR buvo išskirta iš aplas-
35 tinių kiaulių inkstų iš esmės taip, kaip aprašyta

aukščiau. kDNR buvo susintetinta atvirkštinės transkripcijos būdu su BamdT pradmeniu,

BamdT:

5'GACTCGAGGATCCATCGATTTTTTTTTTTTTTTT3' (SEQ ID Nr.:55)
nukreiptu į poliadenosino seką iRNR sekoje. Pirma PCR
amplifikacija (28 ciklai po 60 sek. 95°C, 60 sek. 58°C
5 ir 90 sek. 72°C) buvo atliekama naudojant ML specifinį
h-tiesioginį-1 pradmenį

h-tiesioginis-1:

5'GCTAGCTCTAGAAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCT3' (SEQ ID Nr.:43)
ir BAMAD pradmenį

BAMAD:

5'GACTCGAGGATCCATCG3' (SEQ ID Nr.:56)
100 ml reakcijos mišinio (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10
mM Tris pH 8.0, 0,2 mM dNTP su 0,05 V/ml Amplitaq poli-
10 meraze [Perkin Elmer Inc.]). PCR produktas buvo suskal-
domas su ClaI, ekstrahuojamas fenolio-chloroformo miši-
niu (1:1), išsodinamas etanolio ir liguotjamas į 0.1 mg
Bluescript SK- vektorių (Stratagene Inc.), kuris buvo
suskaldomas su ClaI ir KpnI. Po 2 valandų inkubacijos
15 kambario temperatūroje, vienas ketvirtadalis ligavimo
mišinio buvo pridedamas į kitą PCR ciklą (22 ciklai
aprašyti aukščiau), naudojant kitą specifinį tiesioginį
pradmenį tiesioginis-1

tiesioginis-1:

5'GCTAGCTCTAGAAGCCCGGCTCCTCCTGCCTG3' (SEQ ID Nr.:57)
ir T3-21 (oligonukleotidas, kuris jungiasi šalia
20 poliklonavimo regiono Bluescript SK- vektoriuje):

5'CGAAATTAACCCTCACTAAAG3' (SEQ ID Nr.:58).
Gautas PCR produktas buvo suskaldytas XbaI ir ClaI ir
subklonuotas į Bluescript SK- vektorių. Buvo sekvenuota
keletas nepriklausomų PCR reakcijų klonų.

Buvo identifikuota kita forma, pažymėta pML-2,
25 koduojanti baltymą be keturių amino rūgščių liekanų
(328 amino rūgščių liekanos) (žiūr. Fig. 21 [SEQ ID
Nr.:21]). Lyginant pML ir pML-2 amino rūgščių liekanų

sekas, matome, kad šios sekos yra identiškos, išskyrus tai, kad paskutiniojoje nėra QLPP tetrapeptido, atitinkančio 111-114 liekanas (žiūr. SEQ ID Nr.:18 ir 21). Keturių amino rūgščių liekanų delecija aptinkama pelės, žmogaus ir kiaulės ML kDNR tose pačiose baltymų išvestinių amino rūgščių liekanų sekų vietose.

PAVYZDYS 14

Trombopoetino (TPO) poveikio trombocitų antigeno

10 *GPII_bIII_a ekspresijos indukcijai CMK ląstelėse tyrimas*

CMK ląstelės yra auginamos RPMI 1640 terpėje su 10% embrioninio veršiuko serumo ir 10mM gliutamino. Ląstelės prieš bandymą praplaunamos ir suspenduojamos (5×10^5 ląstelių/ml), beseruminėje GIF terpėje su 5mg/l jaučio insulino, 10mg/l apo-transferino ir įprastu mikroelementų kiekiu. Atitinkamai atskiestas TPO standartas arba tiriami pavyzdžiai po 100 μ l įnešami į kiekvieną 96-šulinėlių plokščiadugnės plokštelės šulinėlį. Tada įnešama po 100 μ l CMK ląstelių suspensijos, ir plokštelės inkubuojamos 48 valandas inkubatoriuje su 5% CO₂ 37°C temperatūroje. Po inkubacijos plokštelės centrifuguojamos penkias minutes 1000 aps./min. 4°C temperatūroje. Supernatantai išpilami ir į kiekvieną šulinėlį pridedama po 100 μ l konjuguotų su FITC'u GPII_bIII_a monokloninių 2D2 antikūnų. Po vienos valandos inkubacijos 4°C temperatūroje, plokštelės vėl centrifuguojamos penkias minutes 1000 aps./min. Supernatantai su neprisijungusiais antikūnais išpilami ir šulinėliai praplaunami 200 μ l 0,1% BSA-PBS tirpalo. Plovimas 0,1% BSA-PBS kartojamas tris kartus. Po to ląstelės analizuojamos naudojant standartinę vienparametrinę analizę, t.y. FASCAN aparatu matuojant santykinę fluorescencijos intensyvumą.

PAVYZDYS 15

Trombopoetino (TPO) poveikio DAMI ląstelių endomitotiniam aktyvumui tyrimas 96-šulinėlių plokštelėse

5 DAMI ląstelės yra auginamos IMDM terpėje su 10% arklio serumo (Gibco), 10mM glutamino, 100ng/ml penicilino G ir 50 µg/ml streptomicino. Prieš bandymą ląstelės yra praplaunamos, suspenduojamos (1×10^5 ląstelių/ml), IMDM terpėje su 1 % arklio serumo
10 ir išpilstomos į 96-šulinėlių apvaliadugnes plokšteles. Į DAMI ląstelių suspensiją plokštelėse pridedama po 100 µl TPO standarto arba tiriamų pavyzdžių ir inkubuojama 48 valandas inkubatoriuje su 5% CO₂ 37°C temperatūroje. Po inkubacijos plokštelės centrifūguojamos Sorvall 6000B centrifugoje penkias minutes
15 1000 aps./min. 4°C temperatūroje. Supernatantas išpilamas, o plokštelės du kartus praplaunamos 200 µl PBS su 0,1% BSA tirpalo. Ląstelės fiksuojamos, pridedant 200 µl atšaldyto 70 % etanolio-PBS, o po to
20 resuspenduojama. Po 15 min. inkubacijos 4°C temperatūroje, plokštelės yra centrifuguojamos penkias minutes 2000 aps./min., supernatantas išpilamas, o į šulinėlius įnešama po 150 µl 1mg/ml RNR'zės su 0,1 mg/ml propidžio jodido ir 0,05 % Tween-20. Po
25 vienos valandos inkubacijos 37°C temperatūroje, tėkmės-citometrijos metodu matuojami DNR kiekio pakitimai. Poliploidija yra įvertinama pagal formulę:

$$\text{NPR} = \frac{(\% \text{last. esančių} > G2+M / \% \text{last. esančių} < G2+M) \text{ su TPO}}{(\% \text{last. esančių} > G2+M / \% \text{last. esančių} < G2+M) \text{ kontrolėje}}$$

30 NPR – normalinis poliploidų santykis.

PAVYZDYS 16

*Trombopoetino (TPO) in vivo nustatymas
(Pelės trombocitų prisijungimo analizė)*

*Trombocitų produkcijos in vivo nustatymas,
naudojant ^{35}S*

5 Siekiant sukelti trombocitopeniją, C57BL6 linijos pelėms (gautos iš Charles River) į pilvo ertmę (IP) (diena 1) buvo suleidžiama 1 ml ožkos serumo prieš pelių trombocitus (6 ampulės). 5 ir 6 dieną pelėms buvo
10 suleidžiamos dvi injekcijos (IP) faktoriaus ar PBS, naudojamo, kaip kontrolė. 7 dieną buvo suleidžiama į veną $30\mu\text{Ci Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 0,1 ml druskos tirpale, ^{35}S įsijungimo į cirkuliuojančius trombocitus procentas nuo suleistos dozės buvo nustatomas kraujo mėginiuose, paimtuose iš bandomųjų ir kontrolinių pelių. Trombocitų ir
15 leukocitų radioaktyvumai buvo matuojami po to tiek pat laiko, paėmus kraują iš retro-orbitalinio sinuso.

PAVYZDYS 17

20 *Trombopoetino (TPO) KIRA ELISA,
įvertinant mpl-Rse.gD chimerinio receptoriaus
fosforilinimą*

Žmogaus mpl receptorius buvo atrastas Vigon et al., PNAS USA, 89:5640-5644 (1992). Chimerinis receptorius, kurio sudėtyje yra ekstralastelinis mpl receptoriaus domenas (ECD), transmembraninis (TM) ir vidulastelinis (ICD) Rse domenai (Mark et al., J. of Biol. Chem., 269(14):10720-10728 [1994]) ir C galinis flag polipeptidas (pvz., Rse.gD), buvo naudojamas KIRA ELISA
25 analizėje, aprašomoje šiame pavyzdyje. Schematinis analizės aprašymas pateiktas Pieš.30 ir 31.

(a) Sujungiančio agento paruošimas

Monoklonaliniai anti-gD (klonas 5B6) buvo pagaminti prieš peptidą iš Herpes simplex viruso glikoproteino D (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6):547-
35

553 [1990]). Išgrynintas preparatas buvo praskiedžiamas iki 3,0 mg/ml koncentracijos fosfatiniu buferiniu tirpalu (PBS), pH 7,4 ir išpilstytas po 1,0 ml buvo saugomas -20°C temperatūroje.

5 (b) *Antikūnių prieš fosfotiroziną paruošimas*

Monokloniniai antikūnai prieš fosfotiroziną (klonas 4G10) buvo gautas iš UBI (Lake Placid, NY) ir biotinilinti, naudojant ilgos grandinės biotin-N-hidroksisukcinamidą (Biotin-X-NHS, Research Organics, Cleveland, OH).

(c) *Ligandas*

mpl ligandas buvo gautas rekombinantiniu būdu, kaip aprašyta šiame išradime. Išgrynintas *mpl* ligandas buvo saugomas 4°C temperatūroje.

15 (d) *Rse.gD nukleino rūgščių paruošimas*

Sintetiniai dvigrandžiai oligonukleotidai buvo panaudoti atstatyti žmogaus Rse C galo 10 amino rūgščių liekanų (880-890) seką, kuri buvo prijungta prie papildomų 21 amino rūgščių liekanų, kuriose yra 5B6 epitopas ir stop kodonas. Lentelėje 10 pateikta sintetinė sulieto geno dalis.

Lentelė 10

Sintetinė dvigrandė žmogaus Rse sulieto geno dalis.

koduojanti grandinė: 5'-TGCAGCAAGGGCTACTGCCACACTCGAGCTGCGCAGATGCTAGCC TCAAGATGGCTGATCCAAATCGATTCCGCGGCAAAGATCTCCGGTCC TGTAGAAGCT-3'	(SEQ ID Nr.:59)
Nekoduojanti (anti-sense) grandinė 5'-AGCTTCTACAGGACCGGAAGATCTTTGCCGCGGAATCGATTGGA TCAGCCATCTTGAGGCTAGCATCTGCGCAGCTCGAGTGTGGCAGTAGC CCTTGCTGCA-3'	(SEQ ID Nr.:60)

25

Sintetinė DNR buvo liguojama su kDNR, koduojančia žmogaus Rse amino rūgščių liekanas nuo 1 iki 880 nukleotido, pradedant nukleotidu 2644 prie PstI skėlimo vietos publikuotoje žmogaus Rse kDNR sekoje (Mark et

al., Journal of Biological Chemistry **269**(14):10720-10728 [1984]) ir su ekspresijos vektoriaus pSV17.ID.LL polilinkerio HindIII skėlimo vieta (žiūr. Fig. 32 A-L; SEQ ID Nr.:22). Taip buvo sukonstruota ekspresinė plazmidė pSV.ID.Rse.gD. Trumpai charakterizuojant, ekspresijos plazmidėje yra dicistroninis pirminis transkriptas, kuriame yra seka, koduojanti DHFR, ribojama 5' splaisingo donoro ir 3' splaisingo akceptoriaus introno splaisingo srities, kurios eina po sekos, koduojančios Rse.gD. Visa (be splaisingo) informacinė seka turi DHFR, kaip pirmą atviro skaitymo rėmelį, todėl generuoja DHFR baltymą, o tai leidžia selekciuonuoti stabilus transformantus.

(e) *mpl-Rse.gD nukleino rūgščių paruošimas*

Ekspresijos plazmidė pSV.ID.Rse.gD, sukonstruota, kaip aprašyta aukščiau, buvo modifikuota į plazmidę pSV.ID.M.tmRd6, kurioje yra sekos, koduojančios žmogaus *mpl* ECD (amino rūgščių liekanos 1-491) sulietą su transmembraniniu domenu ir vidulastelininiu domenu Rse.gD (amino rūgščių liekanos 429-911). Buvo naudojami sintetiniai oligonukleotidai dalies žmogaus *mpl* ekstralastelinio domeno sujungimui su dalimi sekos, koduojančios Rse, atliekant dviejų etapų PCR klonavimo reakciją, kaip aprašyta Mark et al., J. Biol. Chem., **267**:26166-26171 (1992). Pirmame PCR reakcijos etape buvo naudojamas pradmuo M1

5'-TCTCGCTACCGTTTACAG-3' (SEQ ID Nr.:61)

ir pradmuo M2

5'-CAGGTACCCACCAGGCGGTCTCGGT-3' (SEQ ID Nr.:62)

su *mpl* kDNR matrica ir R1

5'-GGGCCATGACACTGTCAA-3' (SEQ ID Nr.:63)

ir R2

5'-GACCGCCACCGAGACCGCCTGGTGGGTACCTGTGG

TCCTT -3' (SEQ ID Nr.:64)

su Rse kDNR matrica. Šios suliejimo vietos PvuII-SmaI fragmentas buvo panaudotas konstruojant pilno ilgio chimerinį receptorių.

(f) *Ląstelių transformavimas*

5 DP12.CHO ląstelės (EP 307,247, publikuotas 1989.03.15) buvo elektroporuojamos su pSV.ID.M.tmRd6 plazmide, kuri buvo linerizuota per unikalią NotI skėlimo vietą. DNR buvo išsodinama etanoliu po ekstrakcijos fenolio/chloroformo mišiniu ir suspenduojama 20 µl
10 1/10 Tris EDTA. Po to prieš elektroporaciją (400 V, 330 µF), 10 µg DNR buvo inkubuojama su 10⁷ CHO DP12 ląstelėmis 1 ml PBS tirpalo lede 10 min. Ląstelės po elektroporacijos buvo išlaikomos 10 min. lede prieš perkeltant jas į neselektyvią terpę. Po 24 valandų
15 ląstelės buvo maitinamos terpe be nukleotidų tam, kad būtų galima atrinkti DHFR⁺ stabilūs klonus.

(g) *Transformuotų ląstelių selekcija KIRA ELISA analizei*

Ekspresijos klonai MPL/Rse.gD buvo identifikuojami
20 westernblotavimu, atlikus visų ląstelių lizato frakcionavimą SDS PAGE, naudojant 5B6 antikūnus, kurie detektuoja gD tag epitopą.

(h) *Terpė*

Ląstelės buvo auginamos F12/DMEM 50:50 terpėje
25 (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). Terpė buvo papildyta 10 % diafiltruotu FBS (HyClone, Logan, Utah), 25mM HEPES ir 2mM L-gliutaminu.

(i) *KIRA ELISA analizė*

Vektoriumi Mpl-Rse.gD transformuotos DP12.CHO buvo
30 perkeltos (po 3×10⁴ viename šulinėlyje) į plokščiadugnes 96 šulinėlių plokšteles kartu su 100 µl terpės ir kultivuojamos per naktį 37°C temperatūroje, esant 5% CO₂. Sekantį rytą šulinėliuose esantis supernetantas buvo dekantuojamas, plokštelės atsargiai nusauginamos
35 ant popierinio rankšluosčio. Į kiekvieną šulinėlį buvo

ipilama po 50 μ l terpės su tiriamaisiais mėginiais arba 200, 50, 12,5, 3.12, 0,78, 0,19, 0,048 ar 0 ng/ml *mpl* ligando. Ląstelės buvo stimuliuojamos 30 minučių 37°C temperatūroje, šulinėliuose esantis supernatantas buvo
5 dekantuojamas ir plokštelės vėl atsargiai nusauginamos ant popierinio rankšluosčio. Siekiant sulizuoti ląsteles ir ištirpinti chimerinį receptorių, buvo pridedama po 100 μ l lizatinio buferinio tirpalo į kiekvieną šulinėlį. Lizatinio buferinio tirpalo sudėtis: 150mM NaCl
10 tirpalas su 50mM HEPES (Gibco), 0,5% Triton-X 100 (Gibco), 0,01% mertiolato, 30 kTV/ml aprotino (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 1mM 4-(2-aminoetil)-benzen-sulfonilflorido hidrochlorido (AEBSF, ICN Biochemicals), 50 μ M leupeptino (ICN Biochemicals) ir 2 mM
15 natrio ortovanadato (Na_3VO_4 , Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), pH 7,5. Plokštelė buvo atsargiai purtoma kratytuve (Bellco Instruments, Vineland, NJ) 60 minučių kambario temperatūroje.

Kol ląstelės buvo tirpinamos, ELISA mikrotitravimo
20 plokštelės (Nunc Maxisorp, Inter Med, Denmark) su sorbuotais per naktį 4°C temperatūroje 5B6 monokloniniais antikūnais (5,0 μ g/ml 50 mM karbonatiniame buferiniame tirpale, pH 9,6, po 100 μ l į vieną šulinėlį) buvo nudekantuojamos ir atsargiai nusauginamos ant popierinio
25 rankšluosčio, po to blokuojamos, ipilant 150 μ l vienam šulinėliui blokavimo buferinio tirpalo [PBS, kuriame yra 0,5 % BSA (Intergen Company, Purchase, NY) ir 0,01 % mertiolato] panaudojant automatinį plokštelių plovimo įrenginį (ScanWasher 300, Skatron Instruments,
30 Inc., Sterling, VA).

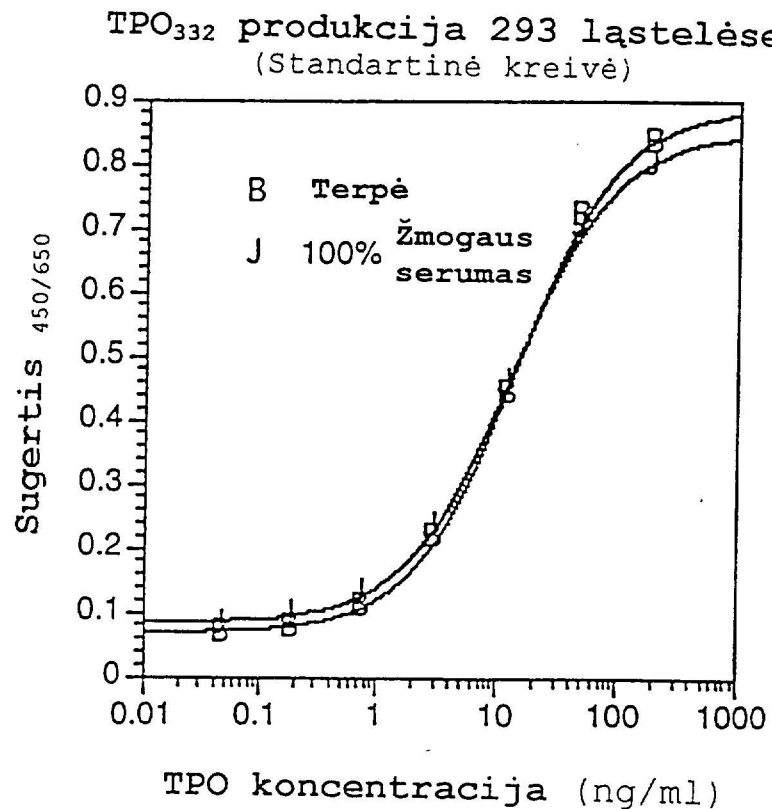
Lizatas su ištirpintu *MPL/Rse.gD* iš audinių kultūros plokštelės šulinėlių buvo perkeliamas (po 85 μ l į šulinėlį) į anti-gD 5B6 padengtus ir blokuotus ELISA plokštelės šulinėlius ir inkubuojama 2 valandas kambario temperatūroje, atsargiai purtant. Neprisijungęs

mpl-Rse.gD buvo pašalinamas praplaunant praplovimo buferiniu tirpalu, ir pridedama po 100 µl biotinilintų 4G10 (antikūnų prieš fosfotiroziną), praskiestų 1:18000 praskiedimo buferiniu tirpalu (PBS, kuriame yra 0,5 % BSA, 0,05 % Tween-20, 5 mM EDTA ir 0,01 % mertiolato), tai yra 56 ng/ml buvo įdedami į kiekvieną šulinėlį. Po 2 val. inkubacijos kambario temperatūroje plokštelė buvo praplaunama, ir į kiekvieną šulinėlį buvo pridedama po 100 µl streptovidino konjugato su krienu peroksidaze (HRPO) (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA), praskiesto 1:60000 praskiedimo buferiniu tirpalu. Plokštelės buvo inkubuojamos 30 min. kambario temperatūroje, švelniai purtant. Neprisijungęs avidino konjugatas buvo išplaunamas, ir į kiekvieną šulinėlį buvo pridedama po 100 µl šviežiai paruošto substrato tirpalo (tétrametilbenzidinas [TMB]; dvikomponentis substrato rinkinys (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD) buvo pridėtas į kiekvieną šulinėlį. Reakcijai įvykti plokštelės buvo laikomos 10 min., po to spalvos susidarymas buvo stabdomas, pridedant į kiekvieną šulinėlį po 100 µl 1,0 M H₃PO₄ tirpalo. Sugertis 450 nm bangoje buvo matuojama, lyginant su sugertimi 650 nm bangoje (ABS_{450/650}), naudojant v_{max} plokštelių daugiakanalį spektrofotometrą (Molecular Devices, Palo Alto, CA), kontroliuojant Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA), duomenys apdorojami DeltaSoft programa (BioMetallics, Inc, Princeton, NJ).

Kalibracinė kreivė buvo sudaroma pagal *dp12.trkA,B* ar *C.gD* ląstelių stimuliaciją, esant 200, 50, 12.5, 3.12, 0,78, 0,19, 0,048 ar 0 ng/ml *mpl* ligando arba išreiškiama kaip ng/ml TPO ir ABS_{450/650} ± sd priklausomybė, naudojant DeltaSoft programą. Pavyzdžių koncentracijos buvo nustatomos pagal sugertį ir iš kalibracinės kreivės išreiškiamos kaip TPO aktyvumas ng/ml.

Nustatyta, kad *mpl* ligandas sugeba aktyvuoti *mpl-Rse.gD* chimerinį receptorių ligand-specifiniu nuo koncentracijos priklausomu būdu. Toliau *mpl-Rse.gD* KIRA ELISA analize buvo nustatyta, kad analizei netrukdo

5 100 % žmogaus serumas (parodyta piešinėlyje) ar 100 % plazma (neparodyta piešinėlyje), tai leidžia naudoti metodą tiriant pacientus ir atliekant pK mėginių analizę.



TPO EC50 apibendrinimas

TPO formos (ląstelės)	EC50 (m/v)	EC50 (moliaringumas)
Hu TPO 332 (293)	2.56 ng/ml	67.4 pM
Mu TPO 332 (293)	3.69 ng/ml	97.1 pM
Hu TPO 153 (293)	~41 ng/ml	~1.08 nM
Hu TPO 155 (<i>E.coli</i>)	0,44 ng/ml	11.6 pM
Hu TPO 153met (<i>E.coli</i>)	0,829 ng/ml	21.8 pM

PAVYZDYS 18

*Trombopoetino nustatymas ELISA metodu, pagrįstas
sąveika su receptoriumi*

ELISA plokštelės buvo padengiamos triušio antikūnų
5 prieš žmogaus IgG (Fc) F(ab')₂ fragmentais karbonati-
niame buferiniame tirpale pH 9,6 per naktį 4°C tempera-
tūroje. Plokštelės buvo blokuojamos 0,5 % jaučio serumo
albuminu PBS kambario temperatūroje 1 valandą. Kultū-
rinė terpė iš fermentatoriaus, turintį chimerinį recep-
10 torių mpl-IgG, buvo įpilama į šulinėlius ir inkubuojama
2 valandas. Toliau į šulinėlius buvo įpilami standarti-
nio pavyzdžio (TPO₃₃₂, produkuotas 293 linijos ląste-
lėse, kurio koncentracija buvo nustatyta pagal amino
rūgščių liekanų analizę) praskiedimų serija (nuo 25 iki
15 0,38 ng/ml, praskiedimo žingsnis 2) ir mėginių praskie-
dimo serijos. Standartas ir mėginiai skiedžiami PBS su
0,5 % jaučio serumo albumino ir 0,05 % Tween 20. Inku-
buojama buvo 2 valandas. Susirišęs TPO buvo detektuo-
jamas, naudojant išgrynintus proteinu-A ir biotini-
20 lintus triušio antikūnus prieš TPO₁₅₅, kuris buvo eks-
presuotas *E. coli* ląstelėse. Po 1 valandos inkubacijos
į šulinėlius buvo įnešama steptavidin-peroksidazė ir
inkubuojama 30 min. Prisijungusi peroksidazė buvo
nustatoma, naudojant substratą - 3,3',5,5'-tetrametil-
25 benzidina. Sugertis buvo įvertinama 450 nm bangoje.
Plokštelės buvo praplaunamos po kiekvienos stadijos.
Duomenų analizei buvo naudojama kalibracinė kreivė,
apdorota, naudojant 4 parametru kreivių aprašymo
Kaleidagraph programa. TPO koncentracijos mėginiuose
30 buvo apskaičiuojamos pagal kalibracinę kreivę.

PAVYZDYS 19

*TPO ekspresija ir išgryninimas iš ląstelių 293
linijos*

1. *Ląstelių 293 linijos ekspresijos vektorių paruošimas*

kDNR, atitinkanti visą TPO baltymą ir esanti atvira-
rame skaitymo rėmelyje, buvo gauta PCR metodo pagalba,
5 naudojant šiuos oligonukleotidinius pradmenis:

LENTELĖ 11
PCR pradmenys

Cla.F1.F: 5' ATC GAT ATC GAT CAG CCA GAC ACC CCG GCC AG 3'	(SEQ ID Nr.:65)
hmp11R: 5' GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA 3'	(SEQ ID Nr.:48)

10 DNR fragmentas buvo amplifikuojamas nuo pRK5-hmp11
matricos (aprašyta Pavyzdyje 9), naudojant pfu DNR
polimerazę (Stratagene). Pradinė denatūracija buvo
altiekama 94°C temperatūroje 7 minutes, po to sekė 25
amplifikacijos ciklai (1 min. 94°C, 1 min. 55°C ir 1
15 min. 72°C). Pabaigoje buvo išlaikoma 72°C temperatūroje
15 minučių. PCR produktas buvo išgrynintas ir klonuotas
tarp ClaI ir XbaI skėlimo vietų pRK5tkneo plazmidėje,
kuri yra sukonstruota modifikuojant pRK5 vektorių.
Vektorius pRK5tkneo.ORF ekspresuoja geną, apsprendžian-
20 tį atsparumą neomicinui ir kontroliuojamą timidinkina-
zės promotoriumi. Antras konstruktas, atitinkantis EPO
homologišką domeną, buvo sukonstruotas tokiu pat būdu,
tik naudojant kiek skirtingą pradmenų porą. Tiesioginis
pradmuo buvo Cla.FL.F (žiūr. Lentelę 11), o atvirkšti-
25 nio pradmens seka buvo tokia:

Arg.STOP.Xba:

5' TCT AGA TCT AGA TCA CCT GAC GCA GAG GGT (SEQ ID Nr.:66)
GGA CC 3'

Galutinis konstruktas buvo pavadinatas pRK5-tkneoEPO-D.
Abiejų konstrukto sekos buvo patvirtintos aprašytu
Pavyzdyje 7 būdu.

2. *Žmogaus embriono inkstų ląstelių transfekcija*

Aukščiau aprašyti konstruktai buvo transfekuoti į žmogaus embriono inkstų ląsteles, naudojant kalcio fosfatinį metodą, aprašyta Pavyzdyje 9. Praėjus 24 val.
5 po transfekcijos, buvo pradama neomicinui atsparių klonų atranka selektyvioje terpėje su 0,4 mg/ml G418. Po 10 - 15 dienų neomicinui atsparūs klonai buvo individualiai perkeliama į 96 šulinėlių plokšteles, toliau auginama iki ląstelių monosluoksniu susidarymo. ML₁₅₃ ir
10 ML₃₃₂ ekspresija buvo įvertinama, tikrinant transfektantų kondicionuotos terpės aktyvumą Ba/F3-*mpl* ląstelių proliferacijos metodu (žiūr. Pavyzdį 1).

3. *rhML₃₃₂ gryninimas*

293-rhML₃₃₂ kondicionuota terpė buvo užnešama ant
15 Blue-Sepharose (Pharmacia) kolonėlės, kuri buvo nulygsvarinta 10 mM natrio fosfatinio buferiniu tirpalu pH 7,4 (buferis A). Kolonėlė paeiliui buvo praplaunama 10 kolonėlės tūrių buferiu A ir buferio A su 2 M karbamido. Baltymai buvo eliujuojami buferiniu tirpalu A su
20 2 M karbamido ir 1 M NaCl. Elijuotos nuo Blue-Sepharose kolonėlės apjungtos frakcijos buvo užnešamos ant WGA-Sepharose kolonėlės, nulygsvarintos buferiniu tirpalu A. Kolonėlė paeiliui buvo praplaunama su 10 kolonėlės tūrių buferio A su 2 M karbamido ir 1 M NaCl,
25 baltymai buvo eliujuojami tuo pačiu buferiniu tirpalu, į kurį pridėta 0,5 M N-acetil-D-glukozamino. Eliuatas nuo WGA-Sepharose kolonėlės buvo chromatografuojamas C4-HPLC kolonėlėje (Synchrom, Inc.) nulygsvarintoje 0,1 % TFA. Nuo C4-HPLC kolonėlės baltymai buvo eliujuo-
30 jami propanolio gradientu (0-25 %, 25-35%, 35-70%). rhML₃₃₂ buvo aptiktas 28-30% propanolio gradiento srityje. SDS-PAGE analizėje išgrynintas rhML₃₃₂ migruoja plačia juosta 68-80 kD srityje (žiūr. Fig. 15).

4. *rhML₁₅₃ gryninimas*

35 293-rhML₁₅₃ kodicionuota terpė buvo gryninama su Blue-Sepharose, kaip aprašyta rhML₃₃₂ atveju. Eliuatas

iš Blue-Sepharose kolonėlės buvo užneštas, kaip aprašyta aukščiau. rhML₁₅₃ eliuatas iš *mpl*-afininės kolonėlės buvo chromatografuojamas C4-HPLC kolonėlėje, kaip aprašyta rhML₃₃₂ atveju. Išgrynintas rhML₁₅₃ SDS-PAGE analizėje išskiriamas kaip dvi dominuojančios juostos ir dvi minorinės juostos, kurių molekulinės masės yra ~18000 - 21000 kD (žiūr. Fig. 15).

PAVYZDYS 20

10 *TPO ekspresija CHO ir gryninimas*

1. *CHO ekspresijos vektoriaus aprašymas*

Ekspresijos vektoriai, panaudoti elektroporacijoje, aprašytoje žemiau, buvo pažymėti:

- 15 pSVI5.ID.LL.MLORF (pilnas arba hTPO₃₃₂), ir
pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (nukirptas arba hTPO₁₅₃).

Šių plazmidžių konstrukcijos yra pateiktos Fig. 23 ir 24.

2. *CHO ekspresijos vektoriaus paruošimas*

20 kDNR, kurioje yra pilnas hTPO atviras skaitymo rėmelis, buvo gauta PCR, naudojant oligonukleotidinius pradmenis, pateiktus Lentelėje 12.

LENTELĖ 12

CHO ekspresijos vektoriaus PCR pradmenys

Cla.FL.F2:

5' ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA (SEQ ID Nr.: 47)
G 3'

ORF.Sal:

5' AGT CGA CGT CGA CGT CGG CAG TGT CTG AGA (SEQ ID Nr.: 67)
ACC 3'

25 PRK5-hmplI (aprašytas Pavyzdžiuose 7 ir 9) buvo naudojamas kaip matrica, esant pfu DNR polimerazei (Stratagene). Pradinė denatūracija buvo atliekama 94°C temperatūroje 7 minutes, po to sekė 25 amplifikacijos ciklai (1 min. 94°C, 1 min. 55°C ir 1 min. 72°C). Pabaigoje buvo išlaikoma 72°C temperatūroje 15 minučių. PCR

produktas buvo gryninamas ir klonuojamas į ClaI ir SaII skėlimo vietą plazmidėje pSVI5.ID.LL, tokiu būdu buvo sukonstruotas vektorius pSVI5.ID.LL.MLORF. Sekantis konstruktas, kuriame yra EPO homologinis domenas, buvo sukonstruotas tuo pačiu keliu, naudojant Cla.FL.F2 kaip tiesioginį pradmenį ir sekantį atvirkštinį pradmenį:

EPOD.SaI:

5'ATG CGA CGT CGA CTC ACC TGA CGC AGA GGG (SEQ ID.Nr.:68)
TGG ACC 3'

Galutinis konstruktas buvo pažymėtas pSVI5.ID.LL.MLEPO-D. Abiejų konstrukto sekos buvo patikrintos aprašytu Pavyzdžiuose 7 ir 9 būdu.

Trumpai, pilno ilgio ir nukirptą ligandą koduojančios sekos buvo įterptos į poliklonavimo sritį CHO ekspresijos vektoriuje pSVI5.ID.LL. Šiame vektoriuje yra ankstyvas promotoriaus/sustiprintojo regionas, modifikuotas splaisingo elementas, kuriame yra pelės DHFR kDNR, poliklonavimo sritis tikslinio geno įterpimui (šiuo atveju TPO sekos), SV40 poliadenilavimo signalas, replikacijos iniciavimo vieta ir beta-laktamazės genas plazmidės selekcijai ir amplifikacijai bakterijose.

3. *Stabilios CHO ląstelių linijos, ekspresuojančios rekombinantinius TPO₃₃₂ ir TPO₁₅₃, sukūrimo metodologija*

a. CHO tėvinių ląstelių linijos aprašymas

CHO (Kinijos žiurkėnių kiaušidžių) ląstelių-šeimininkų linija, naudojama TPO molekulių ekspresijai, yra žinoma kaip CHO-DP12 (žiūr. EP 307247, publikuota 1989.03.15). Ši žinduolių ląstelių linija buvo atrinkta iš transfekuotų tėvinių ląstelių linijos (CHO-K1 DUX-B11(DHFR-)- gautos iš Dr. Frank Lee, Stanford University su Dr. L. Chasin sutikimu) su preproinsulino ekspresijos vektoriumi, tam kad būtų gauti klonai su sumažintu insulino poreikiu. Šios lątelės taip pat yra DHFR-, todėl klonai gali būti atrenkami esant DHFR kDNR

vektoriaus sekoms, auginant terpėje be nukleozidų priedų (glicino, hipoksantino ir timidino). Ši atrankos sistema paprastai naudojama stabilioms ekspresuojančioms CHO ląstelių linijoms atrinkti.

5 *b. Transfekcijos metodas (elektroporacija)*

Ląstelių, ekspresuojančių TPO₃₃₂ ir TPO₁₅₃, linijos buvo gaunamos transfekuojant DP12 ląsteles elektroporacija (žiūr. Anderson, G.L. J.Tiss.Cult. Meth., 15,56 [1993]) atitinkamai su linearizuotomis pSVI5.ID.LL.MLORF ar su pSVI5.ID.LL.MLEPO-D plazmidėmis. Trys (3) restrikcijos fermentų reakcijos mišiniai buvo naudojami kiekvienos plazmidės skėlimui; buvo naudojama 10 µg, 25 µg ir 50 µg vektoriaus, skaldant su NOTI fermentu pagal standartinius molekulinės biologijos metodus. Ši restrikcijos vieta, vienintelė vektoriuje, yra linearizacijos regione 3' gale ir už TPO ligando transkripcijos elementų (žiūr. Fig. 23). 100 µg reakcijos mišinio buvo inkubuojamas per naktį 37°C temperatūroje. Kitą dieną mišinys buvo vieną kartą išekstrahuojamas fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišiniu (50:49:1) ir ekstraktas išsodinamas etanolio, išlaikant sausame lede vieną valandą. Nuosėdos buvo surenkamos centrifuguojant 15 min. ir po to išdžiovinamos. Linearizuota DNR buvo suspenduota į 50 µl Ham DMEM-F12 1:1 terpe, papildant ją standartiniais antibiotikais ir 2 mM gliutamino.

Auginamų DP12 ląstelių suspensija buvo surenkama, praplaunama vieną kartą terpe, naudojama DNR suspendavimui, ir pabaigai suspenduojamos toje pačioje terpėje, esant ląstelių koncentracijai 10⁷ ląstelių 750 µl. Ląstelių suspensijos alikvotos (po 750 µl) ir kiekvienas linearizuotas DNR mišinys buvo inkubuojami kartu kambario temperatūroje vieną valandą ir pernešami į BRL elektroporacijos kamerą. Kiekvienas reakcijos mišinys buvo elektroporuojamas standartiniame elektroporacijos

aparate, esant 350V ir 330 μ F, esant mažai talpuminei varžai. Po elektroporacijos ląstelės buvo paliekamos aparate 5 min. ir po to buvo papildomai išlaikomos 10 min. lede. Elektroporuotos ląstelės buvo perkeliamos į
5 60 mm audinių kultūros lėkšteles, kuriose buvo po 5 ml pilnos standartinės CHO augimo terpės (didelės glukozės koncentracijos DMEM-F12 50:50, be glicino su 1x GHT, 2 mM glutamino ir 5% embrioninio veršiukų serumo) ir auginamos audinių kultūros inkubatoriuje per naktį,
10 esant 5 % CO₂.

c. Tikrinimo ir atrankos metodas

Kita dieną ląstelės buvo tripsinizuojamos nuo plokštelių pagal standartinę metodiką ir perkeltos į 150 mm audinių kultūros lėkšteles su DHFR selektyvia
15 terpe (Ham DMEM-F12, 1:1 terpe, aprašyta aukščiau, papildyta 2 % arba 5 % dializuoto embrioninio veršiukų serumo, bet be glicino, hipoksantino ir timidino - tai yra standartinė DHFR selekcijos terpė). Ląstelės iš kiekvienos 60 mm lėkštelės buvo padauginamos į penkias
20 150 mm lėkšteles. Ląstelės buvo inkubuojamos nuo 10 iki 15 dienų (su vienu terpės pakeitimu) 37°C temperatūroje, esant 5 % CO₂, kol buvo pastebimas klonų augimas ir kol klonų dydis pasiekė dydį, tinkamą pernešti į 96 šulinėlių plokšteles. Po 4-5 dienų ląstelės buvo perke-
25 liamos į 96 šulinėlių plokšteles, naudojant sterilius geltonus pipetmano antgalius (po 50 μ l). Ląstelės buvo paliekamos augti, kol susidarydavo ląstelių monosluoksnis (paprastai 3-5 dienas), ir tripsinizuojamos, kiekvieną kloną išsėjant 2 pakartojimais. Trumpą laiką šios
30 dvi kopijos buvo laikomos šaldiklyje, pridėjus į kiekvieną šulinėlį po 50 μ l 10 % DMSO. Likusi klonų dalis buvo auginama iki monosluoksnio susidarymo, augimo terpė buvo išsiurbiamą ir užpilama beserumine terpe, po penkių dienų tokiuose kondicionuotos terpės mėginiuose
35 buvo nustatoma TPO ekspresija, naudojant analizę su

Ba/F ląstelėmis. Klonai, atrinkti pagal šią analizę ir turintys didžiausią ekspresijos lygį, buvo paimami iš šaldiklio ir pagausinti dviejuose 150 mm T-induose. Pagaugintos ląstelės buvo naudojamos adaptacijai suspensinei kultūrai, pakartotinei analizei ir saugojimui.

d. Amplifikacijos protokolas

Keletas ląstelių linijų, turinčių didžiausią titrą po selekcijos, kuri aprašyta aukščiau, buvo amplifikuojamos metotreksato metodu, siekiant gauti dar didesnio titro klonus. CHO ląstelių klonai buvo padidinti ir pernešti į 10 cm lėkšteles, esant 4 metotreksato koncentracijoms (t. y., 50 nM, 100 nM, 200 nM ir 400 nM) ir dviems ar trimis skirtingoms ląstelių koncentracijoms (10^5 , 5×10^5 ir 10^6 ląstelių lėkštelėje). Šios ląstelės buvo inkubuojamos 37°C temperatūroje, esant 5 % CO₂, kol klonai bus pastebimi ir galima bus perkelti į 96 šulinėlių plokšteles tolesnei analizei. Keletas aukšto titro klonų po šios selekcijos buvo paveikti didesnės koncentracijos metotreksato (t. y., 600 nM, 800 nM, 1000 nM ir 1200 nM), atsparūs klonai buvo perkelti į 96 šulinėlių plokšteles ir tiriami.

4. Stabiliai ekspresuojančių rekombinantinių žmogaus TPO₃₃₂ ir TPO₁₅₃ CHO ląstelių linijos kultivavimas

Saugomos ląstelės buvo atšildomos ir ląstelės pagausinamos standartiniais ląstelių auginimo būdais terpėje kaip su serumu, taip ir be serumo. Pasiekus reikiamą ląstelių tankumą, ląstelės buvo praplaunamos, siekiant pašalinti ląstelių kultūrinę terpę. Ląstelės po to buvo kultivuojamos bet koku standartiniu būdu: induose ar nepertraukiamoje kultūroje 25 - 40°C temperatūroje, esant neutraliam pH ir ištirpusio O₂ kiekiui ne mažiau 5 %, kol susidaro reikiamas sekretuojamo TPO kiekis. Ląstelių kultūros skystis buvo atskiriamas nuo ląstelių mechaniniu būdu, pvz., centrifūguojant.

5. Rekombinantinio žmogaus TPO gryninimas iš CHO auginimo terpės.

Laistelių auginimo terpė (HCCF) buvo užnešama ant Blue Sepharose 6 fast Flow kolonėlės (Pharmacia), nulygsvarintos su 0,01 M natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7.4 su 0,15 M NaCl, apytikriai 100 l HCCF vienam litrai sorbento; linijinis pratekėjimo greitis apie 300 ml/(val*cm²). Kolona buvo praplaunama 3 - 5 kolonos tūriais nulygsvarinimo buferiniu tirpalu, po to 3 - 5 kolonos tūriais 0,01 M natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7,4 su 2,0 M karbamido. TPO buvo eliujuojamas 3-5 kolonos tūriais natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu su 2,0 M karbamido ir 1,0 M NaCl.

Apjungtos po Blue Sepharose frakcijos su TPO buvo užnešamos ant Wheat Germ Lectin Sepharose 6MB kolonos (Pharmacia), nulygsvarintos 0,01 M natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7,4 su 2,0 M urėjos ir 1,0 M NaCl, apytikriai nuo 8 iki 16 ml apjungtų frakcijų nuo Blue Sepharose vienam mililitrui sorbento; linijinis pratekėjimo greitis apie 50 ml/(val*cm²). Kolona buvo praplaunama 2 - 3 kolonos tūriais nulygsvarinimo buferiniu tirpalu. TPO buvo eliujuojamas 2 - 5 kolonos tūriais 0,01 M natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7.4 su 2.0 M karbamido ir 0,5 M N-acetil-D-glukozamino.

I apjungtas Wheat Germ Lectin frakcijas buvo pridėta iki 0,04 % C₁₂E₈ ir 0,1 % trifloracto rūgšties (TFA). Gautas tirpalas buvo chromatografuojamas C4 atvirkščių fazių kolonėlėje (Vydac 214TP1022), nulygsvarinus 0,1 % TFA, 0,04 % C₁₂E₈; užnešama apytikriai 0,2 - 0,5 mg baltymo 1 ml sorbento, pratekėjimo greitis 157 ml/(val*cm²).

Baltymai buvo eliujuojami dviem linijiniais acetonitrilo gradientais su 0,1 % TFA ir 0,04 % C₁₂E₈. Pirmas linijinis gradientas buvo nuo 0 iki 30 % acetonitrilo per 15 min., sekantis - nuo 30 iki 60 % acetonitrilo

per 60 minutes. TPO buvo eliujuojamas, esant apie 50 % acetonitrilo. Surinktos frakcijos buvo analizuojamos SDS PAGE.

Apjungtos po C4 kolonėlės frakcijos buvo praskiestos dvigubu 0,01 M natrio fosfatinio buferinio tirpalo pH 7.4 su 0,15 M NaCl tūriu ir diafiltruojama prieš apytikriai šešis tūrius 0,01 M natrio fosfatinio buferinio tirpalo pH 7,4 su 0,15 M NaCl Anicon YM aparatu ar kitais ultrafiltracijos aparatais, naudojant 10000 - 30000 D pralaidžias membranas. Gautas diafiltratas buvo sukonzentruojamas ultrafiltruojant. Į diafiltracijos koncentratą buvo pridedama Tween-80 iki 0,01 % koncentracijos.

Visas ar dalis koncentrato (nuo 2 iki 5 % kolonos tūrio) buvo užnešama ant Sephacryl S-300 HR kolonos (Pharmacia), nulygsvarintos 0,01 M natrio fosfatinio buferiniu tirpalu, pH 7.4 su 0,15 M NaCl ir 0,01 % Tween-80 ir gelfiltruojama, esant pratekėjimo greičiui 17 ml/(val*cm²). Frakcijos, kuriose po SDS PAGE analizės buvo nustatytas neagregavęs ir be proteinazinės degradacijos produktų TPO, buvo apjungiamos. Apjungtos frakcijos buvo perfiltruotos per 0,22 µm filtrą Millex-GV ar panašų ir saugomos 2-8°C temperatūroje.

25

PAVYZDYS 21

Transformavimas ir TPO sintezės indukcija E. coli

1. TPO ekspresijos vektoriaus *E. coli* konstravimas
Plazmidės pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 ir pMP202 buvo sukonstruotos taip, kad ekspresuotų pirmąsias 155 TPO amino rūgščių liekanas už trumpos lyderinės sekos, kuri buvo skirtinga kiekvienai konstrukcijai. Lyderinė seka leidžia padidinti transliacijos iniciavimo lygį ir palengvina baltymo gryninimą. Plazmidės pMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 buvo sukonstruotos taip, kad ekspresuotų pirmąsias 153 TPO amino rūgščių liekanas po ini-

ciacijos vietos (metionino liekanos), ir kad skirtusi naudojamais pirmųjų TPO šešių amino rūgščių liekanų kodonais. Plazmidė pMP251 yra išvestinė iš pMP210-1 plazmidės, joje TPO baltymo C gale yra papildomos dvi
 5 amino rūgščių liekanos. Visos aukščiau paminėtos plazmidės pasižymi didele TPO ekspresija *E. coli* lastelėse, indukuojant triptofano promotorių (Yansura, D. G. et al., *Methods in Enzymology* (Goeddel, D.V., Ed.) **185**:54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Plazmidės pMP1
 10 ir pMP172 yra tarpinės, konstruojant aukščiau nurodytas plazmides, kurių pagalba ekspresuojamas vidulastelinis TPO.

(a) Plazmidė pMP1

Plazmidė pMP1 yra TPO fragmento, į kuri įeina pirmosios 155 amino rūgščių liekanos, ekspresijos vektorius, ir jis buvo gautas liguojant penkis DNR fragmentus, kaip parodyta Fig. 33. Pirmasis fragmentas - tai vektorius pPho21, kuriame yra pašalintas MluI-BamHI fragmentas. pPho21 yra išvestinis iš phGH1 (Chang, C.N., et al., *Gene* **55**:189-196 [1987]), šiame vektoriuje
 20 žmogaus augimo hormono genas buvo pakeistas *E. coli* phoA genu ir buvo sukonstruota MluI skėlimo vieta STII signalinės sekos vietoje, koduojančioje 20 - 21 amino rūgšties liekaną.

25 Sekantys du fragmentai - DNR iš pRK5-hmp1I (Pavyzdys 9) 258 bazių porų HinfI-PstI fragmentas, koduojantis TPO baltymo seką nuo 19 iki 103 amino rūgščių liekanos ir sintetinis DNR fragmentas, koduojantis TPO baltymo seką nuo 1 iki 18 amino rūgščių liekanos:

5'CGC GTA TGC CAG CCC GGC TCC TCC TGC TTG

TGA CCT CCG AGT CCT CAG TAA ACT GCT TCG TG (SEQ ID Nr.: 69)

ATA CGG TCG GGC CGA GGA GGA CGA

ACA CTG GAG GCT CAG GAG TCA TTT GAC GAA (SEQ ID Nr.: 70)

GCA CTG A-5'

30 buvo pirmiausia liguojami su T4-DNR ligaze, o po to perkerpami su PstI. Ketvirtas yra PstI-HaeIII frag-

mentas iš pRK5hmpI, sudarytas iš 152 bp, koduojantis TPO amino rūgščių liekanų seką nuo 104 iki 155 amino rūgščių liekanos. Paskutinis buvo 412 bp ilgio StuI-BamHI fragmentas iš pdh108, turintis λ iki transkripcijos terminatoriaus, kaip ankščiau aprašyta (Scholtissek, S. et al., NAR 15:3185 [1987]).

(b) Plazmidė pMP21

Plazmidė pMP21 sukonstruota taip, kad ekspresuotų TPO baltymo pirmąsias 155 amino rūgščių liekanas, naudojant STII signalinės sekos dalį iš 13 amino rūgščių liekanų. Ši plazmidė buvo sukonstruota, liguojant tris (3) DNR fragmentus, pateiktus Fig. 34. Pirmas fragmentas buvo padarytas iš vektoriaus pVEG31, iškirpus mažą XbaI-SphI fragmentą. Vektorius pVEG31 yra sukonstruotas iš vektoriaus pHGH207-1 (deBoer, H.A. et al., in Promoter Structure and Funktion (Rodriguez, R.L. and Chamberlain, M.J., Ed.) 462, Prager, New York [1982]). Šiame vektoriuje žmogaus augimo hormono genas buvo pakeistas vaskuliarinio endotelio augimo faktoriaus genu (identiškas vektoriaus fragmentas gali būti gautas iš paskutiniosios plazmidės).

Kita ligavimo dalis buvo sintetinė dvigrandė DNR:

5'-CTA GAA TTA TGA AAA AGA ATA TCG CAT TTC

TT AAT ACT TTT TCT TAT AGC GTA AAG

TCC TTA A (SEQ ID Nr.:71)

AAG AAT TGC GC-5' (SEQ ID Nr.:72)

Paskutinioji 1072 bp dalis buvo MluI-SphI fragmentas iš pMP1, koduojantis 155 TPO baltymo amino rūgščių liekanas.

(c) Plazmidė pMP151

Plazmidė pMP151 sukonstruota taip, kad ekspresuotų TPO baltymo pirmąsias 155 amino rūgščių liekanas už lyderinės seką, į kurią įeina 7 amino rūgščių liekanų STII signalinės sekos, aštuonios histidino liekanos ir faktoriaus Xa skėlimo vieta. Kaip parodyta Fig. 35, pMP151 buvo konstruojama liguojant tris DNR fragmentus.

Pirmasis fragmentas buvo gautas iš anksčiau aprašytos plazmidės pVEG31 iškirpus mažą XbaI-SphI fragmentą ir jį pašalinus. Sekantis fragmentas buvo sintetinė dvi-grandė DNR:

5

```
5'CTA GAA TTA TGA AAA AGA ATA TCG CAT TTC
      TT AAT ACT TTT TCT TAT AGC GTA AAG
      ATC ACC ATC ACC ATC ACC ATC ACA TCG AAG
      TAG TGG TAG TGG TAG TGG TAG TGT AGC TTC
      GTC GTA GCC (SEQ ID Nr.:73)
      GAG CAT-5' (SEQ ID Nr.:74)
```

Paskutinytis buvo 1064 bp ilgio BglI-SphI fragmentas iš plazmidės pMP11, koduojantis TPO baltymo 154 amino rūgščių liekanas. Plazmidė pMP11 identišką plazmidei pMP1, skiriasi tik keliais kodonais STII signalinėje sekoje (šis fragmentas gali būti gaunamas iš pMP1 plazmidės).

(d) Plazmidė pMP202

Plazmidė pMP202 labai panaši į ekspresijos vektorių pMP151, skiriasi tik tuo, kad Xa faktoriaus skėlimo vieta pakeista į trombino skėlimo vietą. Kaip parodyta Fig. 36, pMP202 buvo konstruojama liguojant tris DNR fragmentus. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš anksčiau aprašytos plazmidės pVEG31 iškirpus mažą XbaI-SphI fragmentą ir jį pašalinus. Sekantis fragmentas buvo sintetinė dvigrandė DNR:

```
5'CTA GAA TTA TGA AAA AGA ATA TCG CAT TTC
      TT AAT ACT TTT TCT TAT AGC GTA AAG
      ATC ACC ATC ACC ATC ACC ATC ACA TCG AAC
      TAG TGG TAG TGG TAG TGG TAG TGT AGC TTG
      CAC GTA GCC (SEQ ID Nr.:75)
      GTG CAT-5' (SEQ ID Nr.:76)
```

Paskutinytis buvo 1064 bp ilgio BglI-SphI fragmentas iš aukščiau aprašytos plazmidės pMP11.

(e) Plazmidė pMP172

Plazmidė pMP172 yra TPO fragmento, į kurį įeina pirmosios 153 amino rūgščių liekanos, sekrecijos vek-

25

torius, ir yra tarpinė konstrukcija sudarant plazmidę pMP210. Kaip parodyta Fig. 37, pMP172 plazmidė buvo konstruojama, liguojant tris DNR fragmentus. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš vektoriaus pLS321amB pašalinus mažą EcoRI-HindIII fragmentą. Sekantis 946 bp ilgio EcoRI-HgaI fragmentas buvo gautas iš aukščiau aprašytos plazmidės pMP11. Paskutinis fragmentas buvo sintetinė dvigrandė DNR:

5'TCC ACC CTC TGC GTC AGG T (SEQ ID Nr.:77)

GG AGA CGC AGT CCA TCG A-5' (SEQ ID Nr.:78)

(f) Plazmidė pMP210

10 Plazmidė pMP210 buvo sukonstruota, kad ekspresuotų pirmąsias TPO baltymo 153 amino rūgščių liekanas po transliacijos iniciavimo vietos - metionino liekanos. Ši plazmidė buvo sukonstruota kaip plazmidžių bankas, atsiktinai pakeičiant pirmuosiuose TPO 6 kodonuose trečioje pozicijoje kiekvieno kodono nukleotidą. Šios plazmidės konstravimas atliktas liguojant tris DNR fragmentus pavaizduotas Fig. 38. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš vektoriaus pVEG31 pašalinus mažą XbaI-SphI fragmentą. Sekantis fragmentas buvo sintetinė dvigrandė DNR, pateikta žemiau. Šis fragmentas buvo 20 pirmiausia paveikiamas DNR polimeraze I (Klenow), po to sekė skaldymas XbaI ir HinfI. Fragmentas koduoja iniciacijos metioniną ir atsiktinai pakeistus 6 TPO baltymo kodonus.

5'GCA GCA GTT CTA GAA TTA TGT CNC CNG CNC

CNC CNG CNT GTG ACC TCC GAG TTC TCA GTA

A CAC TGG AGG CTC AAG AGT CAT

AA (SEQ ID Nr.:79)

TTG ACG AAG CAC TGA GGG TAC AGG AGG-5' (SEQ ID Nr.:80)

25 Trečiasis 890 bp ilgio HinfI-SphI fragmentas buvo gautas iš plazmidės pMP172, koduojantis TPO baltymo 19-153 amino rūgščių liekanas.

Su plazmidžių pMP210 banku (apie 3700 klonų) buvo pakartotinai atlikta transformacija, esant didelei tetraciklino koncentracijai (50 µg/ml) LB plokštelėse, tam kad būtų galima atrinkti klonus su dideliu trans-
 5 liacijos iniciacijos lygiu (Yansura, D.G. et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 4:151-158 [1982]). Iš aštuonių klonų augančių, esant didelei tetraciklino koncentracijai, buvo atrinkti penki, kurie ekspresavo daugiausiai TPO baltymo, DNR sekos nustatymui. Rezultatai pateikti Pieš. 39 (SEQ ID Nr.: 23, 10 24, 25, 26, 27 ir 28).

(g) Plazmidė pMP41

Plazmidė pMP41 buvo konstruojama, kad ekspresuotų pirmąsias TPO baltymo 155 amino rūgščių liekanas sulie-
 15 tas su lyderine seka, sudaryta iš 7 STII signalinės sekos amino rūgščių liekanų, sekančių po Xa faktoriaus skėlimo vietos. Plazmidės konstravimas pavaizduotas Fig. 40. Buvo liguojami trys DNR fragmentai. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš plazmidės pVEG31 iškerpant
 20 mažą XbaI-SphI segmentą. Sekantis fragmentas buvo sintetinė dvigrandė DNR:

5'-CTA GAA TTA TGA AAA AGA ATA TCG CAT TTA

TT AAT ACT TTT TCT TAT AGC GTA AAT

TCG AAG GTC GTA GCC

(SEQ ID Nr.:81)

AGC TTC CAG CAT-5'

(SEQ ID Nr.:82)

Paskutinytis ligavimo 1064 bp ilgio BgII-SphI fragmen-
 tas buvo gautas iš anksčiau aprašytos pMP11 plazmidės.

25 (h) Plazmidė pMP57

Plazmidė pMP57 ekspresuoja TPO baltymo pirmąsias 155 amino rūgščių liekanas po lyderinės sekos, sudarytos iš 9 STII signalinės sekos amino rūgščių liekanų ir dviejų bazinių amino rūgščių liekanų - Lys-Arg. Šis
 30 dviejų bazinių amino rūgščių liekanų fragmentas leidžia pašalinti signalinę seką proteinaze ArgC. Šios plazmidės konstravimas pavaizduotas Fig. 41. Buvo liguojami

trys DNR fragmentai. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš ankščiau aprašytos pVEG31 plazmidės pašalinus mažą XbaI-SphI fragmentą. Sekantis fragmentas buvo sintetinė dvigrandė DNR:

5'-CTA GAA TTA TGA AAA AGA ATA TCG CAT TTC

TT AAT ACT TTT TCT TAT AGC GTA AAG

TTC TTA AAC GTA GCC

(SEQ ID Nr.:83)

AAG AAT TTG CAT-5'

(SEQ ID Nr.:84)

- 5 Paskutinis ligavimo 1064 bp ilgio BgII-SphI fragmentas buvo gautas iš ankščiau aprašytos pMP11 plazmidės.

(i) Plazmidė pMP251

- Plazmidė pMP251 yra plazmidės pMP210-1 darinys, i kuria buvo įterptos dvi papildomos amino rūgščių lie-
- 10 kanos TPO baltymo C gale. Šios plazmidės konstravimas pavaizduotas Fig. 42. Plazmidė buvo konstruojama, liguojant du DNR fragmentus. Pirmasis fragmentas buvo gautas, iš plazmidės pMP21 iškerpant mažą XbaI-ApaI segmentą. Antrasis buvo 316 bp ilgio XbaI-ApaI fragmen-
- 15 tas iš plazmidės pMP210-1.

2. *E. coli transformacija ir indukcija TPO ekspresijos vektoriumi*

- Aukščiau aprašyti TPO ekspresijos vektoriai buvo naudojami *E. coli* kamieno 44C6 (w3110 tonA_Δ rpoH_{ts} lon_Δ clpP_Δ galE) transformacijai CaCl₂ temperatūriniu šoku
- 20 (Mendel, M. et al., *J. Mol. Biol.*, **53**:159-162 [1970]). Transformuotos ląstelės pirmiausia buvo auginamos LB terpėje esant 50 μg/ml karbenicilino 37°C temperatūroje, kol sugertis 600 nm bangoje padidėja iki 2 - 3.
- 25 LB terpė po auginimo buvo praskiedžiama 20 kartų M9 terpe, kurioje buvo 0,49 % kazamino rūgščių (m/v) ir 50 μg/ml karbenicilino. Po 15 valandų auginimo aeruojant 30°C temperatūroje ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant.

PAVYZDYS 22

Biologiškai aktyvaus TPO (Met^{-1} 1-153) produkcija*E. coli*

5 Pateikti žemiau biologiškai aktyvaus, su atstatyta struktūra TPO (Met^{-1} 1-153) produkcijos metodai gali būti pritaikyti TPO analogams, tarp jų ir formoms su papildomomis sekomis C ir N baltymo galuose (žiūr. Pavyzdį 23).

10 A. Netirpaus TPO (Met^{-1} 1-153) išskyrimas

E. coli ląstelės, ekspresuojančios TPO (Met^{-1} 1-153), kuris koduojamas plazmide pMP210-1, yra auginamos aukščiau aprašytu būdu. Paprastai apie 100 g ląstelių suspenduojama Polytron homogenizatoriumi viename litre
15 (10 ląstelių kiekio tūrių) ardymo buferinio tirpalo (10 mM tris, 5 mM EDTA, pH 8), ląstelės centrifuguojamos esant 5000 g, 30 min. Praplautos ląstelės vėl suspenduojamos Polytron homogenizatoriumi 1 l ardymo buferinio tirpalo ir ląstelės ardamos LH Cell Disrupter
20 (LH Inceltech, Inc) ląstelių ardymo aparatu ar Microfluidizer (Microfluidics International) aparatu pagal gamintojų instrukcijas. Gauta suspensija centrifuguojama esant 5000 g, 30 min. Nuosėdos suspenduojamos ir centrifuguojama antrą kartą. Praplautos nuosėdos naudojamos iš karto arba užšaldomos -70°C temperatūroje.
25

B. Monomerinio TPO (Met^{-1} 1-153) soliubilizavimas ir gryninimas.

Atplautos nuosėdos buvo suspenduojamos 5 tūriuose (pagal nuosėdų svorį) 20 mM Tris, pH 8 su 6 M guanidino
30 ir 25 mM DTT (ditiotreitolio) ir maišomos 1 - 3 val., ar per naktį 4°C temperatūroje, kad ištirptų TPO baltymas. Galima naudoti ir dideles (6-8 M) karbamido koncentracijas, bet gaunama mažesnė TPO baltymo išeiga, lyginant su guanidinu. Po soliubilizacijos tirpalas
35 nuskaidrinimas centrifuguojant esant 30000 g 30 min.,

tirpale lieka denatūruotas, monomerinis TPO baltymas. Supernatantas chromatografuojamas kolonėlėje su Superdex 200 gelfiltracijos sorbentu (Pharmacia, 2,6x60 cm), tirpalo pratekėjimo greitis - 2 ml/min. Baltymas eliuojamas 20 mM natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 6.0 su 10 mM DTT. Frakcijos eliujuotos nuo 160 iki 200 ml surenkamos, jose buvo monomerinis, denatūruotas TPO baltymas. Toliau TPO baltymas buvo chromatografuojamas pusiau preparatyvinėje atvirkščių fazių C4 kolonėlėje (2x20 VYDAC). Mėginiai buvo užnešami 5 ml/min greičiu ant kolonėlės, nulygsvarintos 0,1 % TFA (trifluoracto rūgštimi) su 30 % acetonitrilo. Baltymai buvo eliujuojami linijiniu acetonitrilo gradientu (30-60 % per 60 min.). Išgrynintas redukuotas baltymas buvo eliujuojamas esant 50 % acetonitrilo. Toks preparatas buvo naudojamas natyvios struktūros atstatymui, kad būtų gautas biologiškai aktyvus TPO variantas.

C. TPO (Met⁻¹ 1-153) biologinio aktyvumo atstatymas

Apie 20 mg monomerinio, redukuoto ir denatūruoto TPO baltymo, esančio 40 ml 0,1 % TFA ir 50 % acetonitrilo tirpale, buvo praskiedžiama 360 ml struktūros atstatymo buferinio tirpalo, turinčio:

50 mM Tris
0,3 M NaCl
5 mM EDTA
2 % CHAPS, paviršiaus aktyvios medžiagos
25 % glicerino
5 mM oksiduoto gliutaciono
1 mM redukuoto gliutaciono
tirpalo pH koreguojamas iki 8,3.

Po sumaišymo, struktūros atstatymo buferinis tirpalas atsargiai maišomas 4°C temperatūroje 12-48 valandas, tam kad būtų pasiekta didžiausia TPO struktūros su teisingais disulfidiniais tilteliais atstatymo išeiga (žiūr. žemiau). Tirpalas po to buvo parūgština-

mas TFA iki galutinės jos koncentracijos 0,2 %, perfiltruotas per 0,45 ar 0,22 μm filtra, pridėdama 1/10 tūrio acetonitrilo. Šis tirpalas buvo chromatografuojamas ant atvirkščių fazių C4 kolonėlės, atstatytos
5 struktūros TPO (Met^{-1} 1-153) baltymas buvo eliuuojamas ta pačia gradiento programa. Šiomis sąlygomis atstatytos struktūros, biologiškai aktyvus TPO baltymas buvo eliuuojamas, esant apie 45 % acetonitrilo koncentracijai. TPO baltymas su netaisyklingais disulfidiniais
10 tilteliais buvo eliuuojamas anksčiau. Galutinis išgrynintas TPO (Met^{-1} 1-153) preparatas turėjo mažiau nei 5 % priemaišų, analizuojant SDS PAGE ir analitine atvirkščių fazių C4 kolonėle. Tyrimams su gyvuliukais išgrynintas po C4 chromatografijos preparatas buvo
15 dializuojams tinkamame fiziologiniame buferiniame tirpale. Buvo naudojami izotoniniai buferiniai tirpalai (10 mM natrio acetato, pH 5,5; natrio sukcinato, pH 5.5; ar 10 mM natrio fosfato, pH 7,4) su 150 mM NaCl ir 0,01 % Tween 80.

20 Kadangi TPO pasižymi dideliu aktyvumu testuojant su BA/F3 ląstelėmis (pusė maksimalios stimuliacijos pasiekama su maždaug 3 pg/ml), todėl galima gauti biologiškai aktyvius preparatus, naudojant daugelį buferinių tirpalų, paviršiaus aktyvių medžiagų ir
25 naudojant įvairias red-oks sistemas. Vis dėlto, dažniausiai kitomis sąlygomis gaunama labai maža dalis teisiškai atstatytos struktūros preparato (<10 %). Gamybiniams procesams reikalinga, kad struktūros atstatymo proceso išeiga būtų ne mažesė kaip 10 %, geriau 30-50 % ir geriausia, kad išeiga būtų didesnė
30 nei 50 %. Struktūros atstatymo stadijoje buvo išbandyta daug paviršiaus aktyvių medžiagų (Triton X-100, dodecil-beta-maltozidas, CHAPS, CHAPSO, SDS, sarkosilas, Tween 20 ir Tween 80, Zwittergent 3-14 ir kiti). Iš
35 šių paviršiaus aktyvių medžiagų buvo nustatyta, kad tik CHAPS grupės (CHAPS ir CHAPSO) paviršiaus aktyvios

medžiagos tinka struktūros atstatymui, sumažinant baltymų agregaciją ir netaisyklingų disulfidinių tiltelių susidarymą. Patartina naudoti didesnes nei 1 % CHAPS koncentracijas. Natrio chloridas reikalingas didesnei proceso išeigai pasiekti, optimali jo koncentracija yra nuo 0,1 M iki 0,5 M. EDTA (1-5 mM) reikalingas metalų jonais katalizuojamų oksidacijos procesų pašalinimui (ir išvengti baltymų agregacijos), šie procesai pastebimi kai kuriems preparatams. Didesnės nei 15 % glicerino koncentracijos sudaro optimalias struktūros atstatymui sąlygas. Tam, kad būtų didesnės proceso išeigos, labai svarbu, kad tirpale būtų red-oks reaktyvų pora: oksiduotas ir redukuotas gliutinationas ar oksiduotas ir redukuotas cisteinas. Paprastai gaunamos didesnės proceso išeigos, kai oksiduotos ir redukuotos formos molinis santykis yra lygus ar didesnis nei vienetas. TPO preparatų struktūros atstatymui optimalus tirpalo pH yra nuo 7,5 iki 9. Organinių tirpiklių (pvz., etanolis, acetonitrilas, metanolis) toleruojama koncentracija yra 10-15 % arba žemesnė. Didinant organinių tirpiklių koncentraciją, didėja baltymo formų su netaisyklingais disulfidiniais tilteliais. Geriausia naudoti TRIS ir fosfatinis buferinius tirpalus. Atstatant baltymo struktūrą 4°C temperatūroje, gaunama didesnė teisingai atstatytos struktūros TPO baltymo išeiga.

TPO preparatams, grynintiems pirmą kartą per C4 kolonėlę, struktūros atstatymo proceso tipiška išeiga sudaro 40-60 % (skaičiuojant nuo redukuoto ir denatūruoto TPO kiekio). Biologiškai aktyvūs preparatai gali būti gaunami, kai struktūros atstatymo procese naudojami mažiau išgryninti TPO preparatai (pvz., po Superdex 200 gelfiltracijos ar po intarpinių kūnelių ekstrakcijos), bet šiais atvejais šio proceso išeiga būna mažesnė dėl didelio baltymo išsėdimo į nuosėdas ir dėl priemaišinių baltymų trukdymo.

Kadangi TPO (Met^{-1} 1-153) baltymo sudėtyje yra keturios cisteino liekanos, tai galimi trys skirtingi disulfidinių tiltelių susidarymo variantai šiame baltyme:

- 1 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-4 ir 2-3 cisteino liekanos
- 2 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-2 ir 3-4 cisteino liekanos
- 3 variantas: disulfidinis ryšys tarp 1-3 ir 2-4 cisteino liekanos

5 Pradinių struktūros atstatymo sąlygų tyrimuose buvo naudojama keletas frakcijų TPO baltymo po chromatografijos atvirkštinių fazių kolonėlėje C4. Tik viena frakcija pasižymėjo žymesniu biologiniu aktyvumu, tiriant su BA/F3 ląstelėmis. Vėliau struktūros atsta-
10 tymo sąlygos buvo optimizuojamos, naudojant šiuos preparatus. Šiomis sąlygomis neteisingos struktūros baltymo kiekis buvo mažesnis nei 10-20 % nuo bendro gauto monomerinio TPO kiekio.

Biologiškai aktyvaus TPO disulfidinių tiltelių
15 išsidėstymas buvo nustatytas remiantis masės spektroskopija ir analizuojant baltymo amino rūgščių liekanų seką. Biologiškai aktyvaus TPO baltymo disulfidinių tiltelių vietos yra tarp 1-4 ir 2-3 cisteino liekanos (t.y., 1 variantas). Baltymo frakcijų po C4 chromato-
20 grafijos mėginiai (5-10 nM) buvo skaldomi tripsinu (tripsino ir baltymo molinis santykis 1:25). Skaldymo mišinys buvo analizuojamas matricine lazerine desorb-
cine masės spektroskopija prieš ir po redukcijos DDT. Po redukcijos buvo nustatomi baltymo fragmentai,
25 atitinkantys didžiausius tripsininis TPO fragmentus. Neredukuotuose pavyzdžiuose keletas iš šių fragmentų nebuvo nustatyti, bet atsirasdavo kitos molekulinės masės fragmentai. Naujai atsiradusiųjų fragmentų mole-
kulinė masė daugeliu atvejų sutapo su atskirų tripsini-
30 nių peptidų, dalyvaujančių disulfidinių tiltelių susi-

daryme, molekulinų masių suma. Taigi, galima neabejotinai teigti, kad teisingos disulfidinių jungčių vietos atstatytos struktūros rekombinantiniame biologiškai aktyviame TPO baltyme yra tarp 1-4 ir 2-3 cisteino
 5 liekanų. Tai sutampa su žinomomis disulfidinių jungčių vietomis eritropoetino molekulėje.

D. Rekombinantinio atstatytos struktūros

TPO (Met 1-153) biologinis aktyvumas

Atstatytos struktūros išgrynintas TPO(Met⁻¹ 1-153)
 10 pasižymėjo aktyvumu kaip *in vitro*, taip ir *in vivo* tyrimuose. Tiriant BA/F3 ląstelėse, buvo nustatyta, kad pusė maksimalios timidino įsijungimo į BA/F3 ląsteles stimuliacijos buvo pasiekama su 3,3 pg/ml (0,3 pM) TPO. Mėginius tiriant ELISA, pagrįsta sąveika su *mpl* recep-
 15 toriumi, pusė maksimalaus aktyvumo pasiekama esant 1.9 ng/ml (120 pM) TPO koncentracijai. Normaliuose ir mielosupresuotuose gyvūnuose, apšvitintuose beveik letalia Rentgeno spindulių doze, TPO(Met⁻¹ 1-153) labai efektyviai stimuliuo naujų trombocitų susidarymą
 20 (aktyvumas buvo pastebimas net esant 30 ng/pelei dozei).

PAVYZDYS 23

Kitų biologiškai aktyvių TPO variantų produkcija

E. coli

Trys skirtingi TPO variantai, produkuojami *E. coli*, buvo išgryninti ir atstatyta baltymų struktūra iki biologiškai aktyvių preparatų. Šie variantai buvo tokie:

30 (1) MFL - 13 amino rūgščių liekanų iš bakterinės STII signalinės sekos buvo sulieta su TPO domeno(1-155 amino rūgščių liekanos) N galu. Gauta galutinė seka:
MKKKNIAFLLNAYASPAPPAC...CVRRA (SEQ ID Nr.:85),
 kur lyderinė seka yra pabraukta, C...C pažymėta seka nuo Cys7 iki Cys151. Šis variantas buvo sukonstruotas, kad
 35 būtų galima pažymėti tirozino liekanas radioaktyviu

jodu - toks TPO baltymas buvo naudojamas tiriant receptorius ir įvertinant biologinį aktyvumą.

(2) H8MFL - 7 amino rūgščių liekanos iš STII sekos, 8 histidino liekanos ir Xa faktoriaus fermentinio skėlimo vieta IEGR buvo sulieta su TPO baltymo domeno (1-155 amino rūgščių liekana) N galu. Galutinė seka:

MKKNIAFH8HHHHHHIEGRSPAPPAC...CVRRA (SEQ ID Nr.:86),

kur lyderinė seka yra pabraukta, C...C pažymėta seka nuo Cys7 iki Cys151. Šis TPO baltymo variantas po išgryninimo ir struktūros atstatymo gali būti paveiktas fermentu - Faktoriumi Xa, kuris skelia grandinę po arginino liekanos sekoje IEGR. Po skaldymo gaunamas TPO baltymo variantas su 155 amino rūgščių liekanų seka, kuriame kaip ir gamtiniame baltyme yra serino liekana baltymo N gale.

(3) T-H8MFL - buvo sukonstruotas kaip variante (2), išskyrus tai, kad trombino skaldoma seka IEPR buvo sulieta su TPO domeno N galu. Galutinė seka:

MKKNIAFH8HHHHHHHHIEPRSPAPPAC...CVRRA (SEQ ID Nr.:87),

kur lyderinė seka yra pabraukta, C...C pažymėta seka nuo Cys7 iki Cys151. Šis TPO baltymo variantas po išgryninimo ir struktūros atstatymo gali būti paveiktas trombinu. Po skaldymo gaunamas gamtinis N galo TPO baltymo variantas su 155 amino rūgščių liekanų seka.

A. *Biologiškai aktyvaus TPO variantų (1), (2) ir (3) išskyrimas, soliubilizavimas ir monomerinių formų išgryninimas.*

Visi šie TPO baltymo variantai buvo ekspresuoti *E. coli*. Šių variantų baltymų pagrindinis kiekis buvo produkuojams intarpiniuose kūneliuose, tai buvo nustatyta TPO (Met^{-1} 1-153) atveju Pavyzdyje 22. Buvo naudojami identiškai baltymų išskyrimo, soliubilizavimo ir monomerinių TPO variantų gryninimo metodai, kaip ir aprašyti Pavyzdyje 22. Buvo naudojamos identiškos struktūros atstatymo sąlygos, kaip ir TPO (Met^{-1} 1-153)

atveju , bendra šios stadijos išeiga sudarė 30-50 %. Po struktūros atstatymo TPO variantai buvo chromatografuojami C4 atvirkščių fazių kolonėlėje, esant 0,1 % TFA, naudojant aprašytą aukščiau acetonitrilo gradientą.

5 Visi TPO variantai (proteolitiškai nesuskaldyti) pasižymėjo biologiniu aktyvumu, vertinant Ba/F3 analizėje, jų pusiau maksimalus aktyvumas buvo nuo 2 iki 5 pM.

B. Variantų (2) ir (3) proteolitinis skaldymas, gaunant TPO su gamtiniu N baltymo galu (1-155)

10 Aprašyti aukščiau TPO variantai (2) ir (3) buvo sukonstruoti su papildoma fermetais nuskeliama lyderine seka prieš normalaus TPO baltymo N galinę amino rūgščių liekaną. Po struktūros atstatymo ir išgryninimo aprašyti aukščiau (2) ir (3) TPO variantai buvo skaldomi

15 jiems tinkamais proteolitiniais fermentais. Iš kiekvieno varianto eliuatų nuo C4 kolonėlės acetonitrilas buvo pašalinamas prapučiant tirpalus nestipria azoto srove. Po to variantai buvo paveikti arba Faktoriumi Xa, arba trombinu.

20 TPO varianto (2) atveju buvo pridedama į tirpalą, iš kurio buvo pašalintas acetonitrilas, 1 M Tris buferinio tirpalo, pH 8,0 iki galutinės jo koncentracijos 50 mM ir tirpalo pH buvo koreguojamas, kad būtų lygus 8. NaCl ir CaCl₂ buvo atitinkamai įdedama iki

25 0,1 M ir 2 mM. Faktoriaus Xa (New England Biolabs) buvo įdedama, kad molinis fermento ir TPO baltymo varianto santykis būtų nuo 1:25 iki 1:100. Mėginys buvo inkubuojamas 1 - 2 valandas kambario temperatūroje, siekiant maksimalaus nuskėlimo, šis procesas buvo kontroliuojamas SDS PAGE analize pagal baltymo migraciją gelyje.

30 Po to reakcijos mišinys buvo gryninamas C4 atvirkščių fazių chromatografija, naudojant tokį pat gradientą ir chromatografijos sąlygas, kaip aprašyta aukščiau gryninant taisyklingos struktūros baltymus. Nesuskaldytas

35 variantas B buvo atskiriamas nuo skaldyto varianto (2) šiomis sąlygomis. Po skaldymo buvo nustatyta

baltymo N galo seka - SPAPP, tai įrodo, kad sėkmingai buvo pašalinta lyderinė baltymo seka. Faktorius Xa taip pat gali skelti ir kitoje TPO baltymo sekos vietoje; gali nuskelti ties 118 arginino liekana, tuo atveju

5 baltymo N gale seka yra TTAHKD- (SEQ ID Nr.:88). Atiekant skaldyto Faktoriumi Xa varianto SDS PAGE analizę neredukuojančiomis sąlygomis, stebima viena baltymo juosta, atitinkanti 17000 D molekulinę masę; atliekant SDS PAGE analizę redukuojančiomis sąlygomis, stebimos

10 dvi baltymo juostos, atitinkančios 12000 ir 5000 D molekulinę masę, jei baltymas buvo suskaldytas ties 118 arginino liekana. Šis rezultatas paaiškinamas tuo, kad dvi molekulės dalys yra sujungtos tarpusavyje disulfidiniu tilteliu tarp 1 ir 4 cisteino liekanos, tai buvo

15 nustatyta analizuojant baltymo tripsininį žemėlapi, kaip aprašyta ankščiau. Matuojant biologinį aktyvumą su Ba/F3 ląstelėmis, buvo nustatyta, kad išgrynintam TPO (1-155) variantui, pašalinus N gale lyderinę seką ir perskėlus baltymą viduryje, pusė maksimalaus aktyvumo

20 sudarė nuo 0,2 iki 0,3 pM.

TPO varianto (3) atveju skaldymo buferinis tirpalas buvo 50 mM Tris, pH 8, 2 % CHAPS, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA ir žmogaus ar jaučio trombinas (Calbiochem) santykiu nuo 1:25 iki 1:50 (fermento masė su TPO varianto

25 baltymo kiekiu). Baltymo skaldymas buvo vykdomas 2 - 6 valandas kambario temperatūroje. Skaldymo eiga buvo įvertinama SDS PAGE analize, kaip aprašyta skaldant baltymą Faktoriumi Xa. Šiuo atveju buvo pasiekama didesnė nei 90 % skaldymo išeiga. Gautas TPO baltymas

30 buvo chromatografuojamas C4 atvirkščių fazių kolonėlėje, kaip aprašyta aukščiau, po chromatografijos buvo nustatyta, kad baltymas turi N galo baltymo seką. Tik nedidelė (<5 %) baltymo dalis buvo suskaldyta vidinėje baltymo sekos dalyje ties ta pačia arginino ir treonino

35 jungties vieta, kaip ir skaldant faktoriumi Xa. Galutinis TPO baltymas pasižymėjo dideliu biologiniu aktyvu-

mu, jo 0,2 - 0,4 pM sukėlė pusę maksimalaus atsako Ba/F3 ląstelėse. Analizuojant ELISA metodu, kuris paremtas sąveika su *mpl* receptoriumi, šis baltymas sukėlė pusę maksimalaus atsako, esant jo koncentracijai 2 -
5 4 ng/ml (120-240 pM išgryninto baltymo). Tuo tarpu neskaldyto baltymo, turinčio lyderinę seką, aktyvumas abiejose analizėse buvo 5 - 10 kartų mažesnis. Atliekant tyrimus su gyvuliniais, HPLC išgrynintas suskaldytas baltymas buvo dializuojamas fiziologiniame buferiniame tirpale su 150 mM NaCl, 0,01 % Tween 80 ir 10 mM
10 natrio sukcinato, pH 5.5 arba 10 mM natrio acetato, pH 5,5, arba 10 mM natrio fosfato, pH 7,4. Analizuojant HPLC ir SDS PAGE analize, buvo nustatyta, kad išgrynintas baltymas stabilus keletą savaičių, kai saugomas 4°C
15 temperatūroje. Normaliuose ir mielosupresuotuose pelėse šis išgrynintas TPO baltymas su natyviu N galu labai efektyviai stimuliuoja naujų trombocitų susidarymą, aktyvumas buvo pastebimas net esant jo dozei 30 ng/pelei.

20

PAVYZDYS 24

Sintetinis mpl ligandas

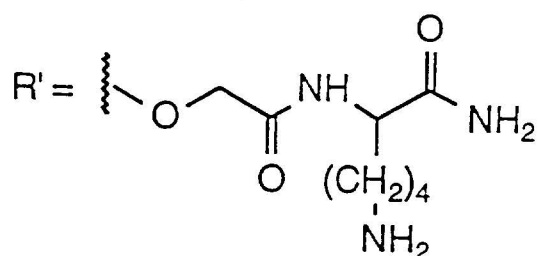
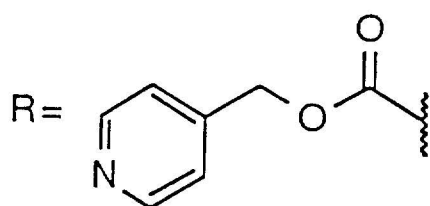
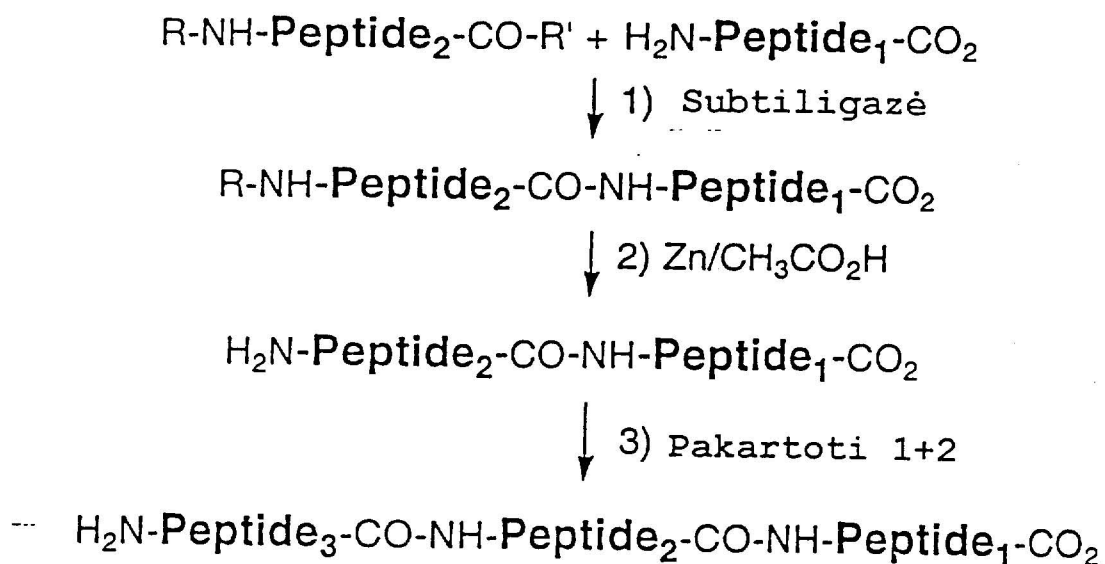
Nors žmogaus *mpl* ligandas (hML) paprastai gaunamas naudojant rekombinantinius metodus, šis baltymas taip pat gali būti gaunamas, fermentais liguojant sintetinius baltymo fragmentus aprašytais žemiau metodais.
25 Sintetinat hML galima įvesti nenatūralias amino rūgščių liekanas ar sintetinius elementus, tokius, kaip polietilenglikolis. Anksčiau buvo nustatyta, kad mutantinė serininė proteinazė subtilizinas BPN, subtiligazė
30 (S221C/P225A), efektyvi liguojant peptidų esterius vandeniniuose tirpaluose (Abrahmsen *et al.*, *Biochem.*, 30:4151-4159 [1991]). Buvo parodyta, kad sintetiniai peptidai gali būti fermentiniu būdu nuosekliai liguojami, ir gaunami ilgi polipeptidai, pasižymintys
35 fermentiniu aktyvumu, ar baltymai, tokie kaip ribonukleazė A (Jackson *et al.*, *Science*, [1994]). Šis

metodas, žemiau aprašytas detaliau, įgalina mus cheminiu būdu sintetinti baltymus, kurie ankščiau buvo gaunami tik rekombinantinės technologijos būdu.

hML153 sintezės, naudojant subtiligazę, strategija
5 pateikta Schemoje 1. Pradedant nuo pilnai deblokuoto peptido, atitinkančio baltymo C galą, subtiligaze prijungiamas N gale apsaugoto ir C gale aktyvuoto sekančio peptido esteris. Kai reakcija pasibaigia, produktas išskiriamas chromatografuojant HPLC atvirkščiose fazėse,
10 pašalinama apsauginė grupė N gale. Sekantis peptido fragmentas liguojamas, pašalinamos apsauginės grupės ir procesas kartojamas, naudojant taisyklingus peptidus, kol susintetinamas norimo ilgio baltymas. Procesas panašus į kietafazinį metodą, bet šiuo atveju peptido N
15 galas yra apsaugomas, C galas aktyvuojamas, peptidas liguojamas prie N galo, baltymas sintetinamas C→N kryptimi. Kadangi kiekvienoje prijungimo stadijoje peptidą galima pailginti iki 50 amino rūgščių liekanų, šie tarpiniai produktai yra išskiriami po kiekvieno
20 ligavimo ir todėl ilgesni išgryninti baltymai gali būti sintetinami priimtinomis išeigomis.

SCEMA 1

hML sintezės, naudojant subtiligazę, strategija



- 25 Remiantis žiniomis apie subtiligazės specifiškumą,
o taip pat biologiškai aktyvaus hML "epo-domeno" amino
rūgščių liekanų seka, mes padalijom hML153 į septynis
18 -15 amino rūgščių liekanų ilgio fragmentus. 18 - 15
amino rūgščių liekanų ligavimo efektyvumas buvo patik-
30 rintas, naudojant sintetinius tetrapeptidus. Lentelė-
je 13 pateikti bandomojo ligavimo rezultatai.

LENTELĖ 13

hML bandomasis ligavimas. Donoras ir nukleofiliniai peptidai (10 mM) buvo ištirpinti 100 mM Tricine (pH 7,8) 22°C temperatūroje. Ligazės buvo pridėdama iki galutinės jos koncentracijos 10 μM (naudojamas buvo 1,6 mg/ml tirpalas [apie 70 μM]), ligavimas buvo vykdomas per naktį. Išeigos nurodytos ligavimo % nuo peptidų donorų hidrolizės.

10

Vieta	Donoras (glc-K-NH ₂)	Nukleofilas-NH ₂	Hidrolizė, %	Ligavimas, %
1 (23/24)	HVLH (SEQ ID Nr.:89)	SRLS (SEQ ID Nr.:90)	92	08
(22/23)	SHVL (SEQ ID Nr.:91)	HSRL (SEQ ID Nr.:92)	48	52
2 (46/47)	AVDF (SEQ ID Nr.:93)	SLGE (SEQ ID Nr.:94)	22	78
3 (69/70)	AVTL (SEQ ID Nr.:95)	LLEG (SEQ ID Nr.:96)	53	47
4 (89/90)	LSSL (SEQ ID Nr.:97)	LGQL (SEQ ID Nr.:98)	95	05
(88/89)	C(acm)LSS (SEQ ID Nr.:99)	LLGQ (SEQ ID Nr.:100)	00	00
(90/91)	SLL (SEQ ID Nr.:101)	GQLS (SEQ ID Nr.:102)	45	55
(88/89)	CLSS (SEQ ID Nr.:103)	LLGQ (SEQ ID Nr.:100)	90	10
5 (107/108)	LQSL (SEQ ID Nr.:104)	LGTQ (SEQ ID Nr.:105)	99	01
(106/107)	ALQS (SEQ ID Nr.:106)	LLGT (SEQ ID Nr.:107)	70	30
6 (128/129)	NAIF (SEQ ID Nr.:108)	LSFQ (SEQ ID Nr.:109)	60	40

Remiantis šiais eksperimentais, lentelėje 14 išvardinti peptidai turi efektyviai liguotis su subtiligaze. Tinkamos apsauginės grupės kiekvieno donorinio peptidinio esterio N gale reikalingos, norint išvengti peptidų tarpusavio ligavimosi. Mes pasirinkome izonikotinilo (iNOC) apsauginę grupę (Veber et al., *J. Org. Chem.*, **42**:3286-3289 [1977]), nes ji tirpi vandenyje, ir gali būti naudojama paskutinėje ketafazinėje peptidų sintezės stadijoje, taip pat ji atspari HF, kai ši rūgštis naudojama apsauginių grupių nuėmimui ir atske-

20

liant peptidus nuo sintezės matricos. Papildomai ji gali būti pašalinta nuo peptidų po kiekvienos ligavimo stadijos švelniomis redukcinėmis sąlygomis ($\text{Zn}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) ir taip gaunamas neblokuotas peptido N galas sekančiam

5 ligavimo žingsniui. Esteris glikolat-lizil-amidas (glc-K-NH₂) buvo naudojamas aktyvuoti peptidų C galą. Šis pasirinkimas buvo paremtas parengtiniais eksperimentais, kuriuose buvo parodyta, kad jis yra efektyvus liguojant subtiligaze (Abrahmsen et al., *Biochem.*, **30**:

10 4151-4159 [1991]). Peptidai, apsaugoti iNOC grupe ir aktyvuoti glc-K-amidine grupe, gali būti sintetinami standartiniais kietafaziniais metodais, kurie yra pateikti Schemoje 2. Peptidai nuosekliai buvo liguojami, kol buvo susintetinamas pilno ilgio baltymas,

15 galutinio produkto struktūra buvo atstatoma *in vitro*. Pagal homologiją su EPO, disulfidiniai tilteliai turi būti sudaryti tarp 7 - 151 ir 18 - 85 cisteino liekanų. Disulfidinių jungčių oksidavimas gali būti atliktas tiesiog maišant tirpalą deguonies atmosferoje keleta

20 valandų. Atstatytos struktūros produktas gali būti išgryninamas, naudojant HPLC, o frakcijos, kuriose yra aktyvus baltymas, surenkamos ir liofilizuotos. Alternatyviu būdu disulfidinės jungtys gali būti skirtingais būdais apsaugotos, siekiant kontroliuoti disulfidinių

25 tiltelių oksidaciją tarp specifinių disulfidinių porų. Apsaugant 7 ir 151 cisteino liekanas acetamidometilo grupe (acm), galima oksiduoti 28 ir 85 cisteino liekanas atskirai. Nuo blokuotų liekanų acm grupės pašalinamos, o 7 ir 151 cisteino liekanos oksiduojamos. Ir

30 atvirkščiai - 28 ir 85 cisteino liekanos gali būti blokuojamos acm, jeigu oksidacija reikalinga tam, kad susidarytų taisyklingos struktūros baltymas. Papildomai 28 ir 85 cisteino liekanos gali būti pakeistos kitomis natūraliomis arba sintetinėmis liekanomis, ne cisteinu,

35 tam kad būtų galima atlikti taisyklingą oksidaciją tarp 7 ir 151 cisteino liekanų.

LENTELE 14

Peptidai, naudojami viso h-ML baltymo sintezei su subtiligazę.

Seka	Fragmentas
1 (SEQ ID Nr.:110)	iNOC-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL-glc-k-NH ₂ (1-22)
2 (SEQ ID Nr.:111)	iNOC-NH-HSRLSQCPVHPLTPVLLPAVDF-glc-k-NH ₂ (23-46)
3 (SEQ ID Nr.:112)	iNOC-NH-SLGEWKTQMEETKAQDILGAVTL-glc-k-NH ₂ (47-69)
4 (SEQ ID Nr.:113)	iNOC-NH-LLEGVMAARGQLGPTCLSSLL-glc-k-NH ₂ (70-90)
5 (SEQ ID Nr.:114)	iNOC-NH-GQLSGQVRLLLGALQS-glc-k-NH ₂ (91-106)
6 (SEQ ID Nr.:115)	iNOC-NH-LLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIF-glc-k-NH ₂ (107-128)
7 (SEQ ID Nr.:116)	iNOC-NH-LSFQHLRGKVRFLMLVGGSTLCVR-CO ₂

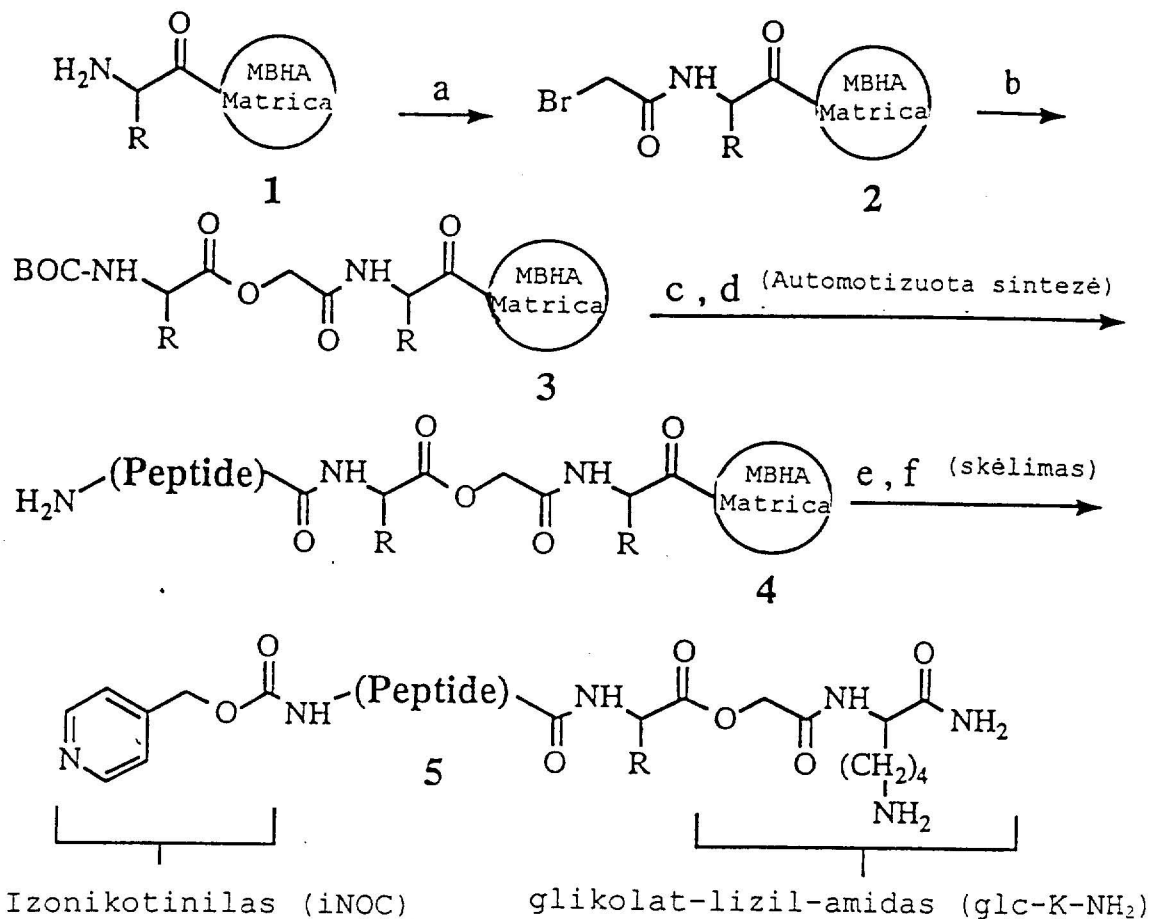
- 5 Peptidų ligavimas buvo atliekamas 25°C temperatūroje 10 mM tricino buferiniame tirpale, pH 8 (šviežiai paruoštas ir degazuotas filtruojant vakuume per 5 µm filtrą). Paprastai C galo peptidinis fragmentas buvo ištirpinamas buferiniame tirpale (2-5 mM peptido)
- 10 ir buvo pridedamas 10x subtiligazės pradinis (1 mg/ml subtiligazės 100 mM tricino buferiniame tirpale, pH 8) tirpalas iki galutinės fermento koncentracijos apie 5 µM. 3 - 5 kartų molinis perteklius glc-K-NH₂ aktyvuoto donorinio peptido buvo pridedama arba kaip sausa
- 15 medžiaga, arba kaip tirplas, ir reakcijos mišinys buvo paliekamas 25°C temperatūroje. Ligavimo eiga buvo įvertinama C18 atvirkščių fazių HPLC chromatografija (CH₃CN/H₂O gradientas su 0,1 % TFA). Ligavimo produktai buvo gryninami preparatyvine HPLC ir liofilizuojami.
- 20 Isonicotinilo (INOC) apsauginės grupės buvo pašalinamos maišant su HCl aktyvuotomis Zn dulkėmis, apsaugant peptidą acto rūgštimi. Nesureagavusios cinko dulkės buvo pašalinamos filtruojant, o acto rūgštis - garinant vakuume. Gautas polipeptidas gali būti iš karto naudo-
- 25 jamas ligavimui ir procesas vėl kartojamas. Sintetinis hML₁₅₃ gali būti gautas, liguojant aukščiau aprašytu būdu, su sintetiniu ar rekombinantiniu hML₁₅₄₋₃₃₂ bal-

tymu, ir taip gaunamas sintetinis arba pusiau sintetinis viso ilgio hML.

Sintetinis hML baltymas yra pranašesnis už rekombinantinį. Sintetinio baltymo sudėtyje gali būti padaromi įvairūs pakeitimai, siekiant padidinti aktyvumą ar specifiškumą. Polimerinai dariniai, pvz., polietilenglikolis gali būti įjungti į baltymą, kad prolonguotų baltymo veikimą. Pavyzdžiui, polietilenglikolis gali būti prijungtas prie lizino liekanos kuriame nors individualiame fragmente (Lentelė 14) prieš arba po vieno ar kelių ligavimo žingsnių. Proteinazėms jautrios peptidinės jungtys gali būti pašalinamos arba pakeičiamos tam, kad būtų padidintas baltymo stabilumas *in vivo*. Papildomai gali būti įvedami sunkiųjų metalų atomai, kad būtų galima palengvinti baltymo struktūros nustatymą.

SCHEMA 2

Kietafazinė peptidų fragmentų, skirų segmentų
ligavimui, sintezė



- 25 a) Lysil-parametylbenzhidrilamino (MBHA) matrica 1 (0,63 mekv/g, Chemtech) buvo maišoma su bromacto rūgštimi (5 ekv.) ir diizopropilkarbodiimidu (5 ekv.) vieną valandą 25°C temperatūroje dimetilacetamido (DMA) tirpale; gaunamas bromacetilo darinys 2.
- 30 b) Matrica buvo gerai atplaunama DMA ir individualios Boc-blokuotos (3 ekv., Bachem) amino rūgštys buvo esterifikuojamos, maišant su natrio hidrokarbonatu (6 ekv.) dimetilformamide (DMF) 24 valandas 50°C temperatūroje, kad būtų galima jas prijungti prie
- 35 glikolatfenilalanilamidinės matricos 3. Aminoaceti-

linta matrica 3 buvo po 3 kartus praplaunama DMF ir dichlormetanu (CH_2Cl_2). Taip paruoštą matricą galima saugoti kambario temperatūroje keletą mėnesių. Matrica 3 gali būti naudojama automatiniame peptidų sintetizatoriuje (Applied Biosystems 430A), peptidai gali būti prijungiami pagal standartinius kietafazės peptidų sintezės metodus (5).

c) N- α -Boc grupės pašalinamos 45 % trifluoracto rūgšties tirpalu dichlormetane.

10 d) Po to Boc-apsaugotos amino rūgštys (5 ekv.) yra preaktyvuojamos su benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)fosfonio heksafluorofosfatu (BOP, 4 ekv.) ir N-metilmorfolinu (NMM, 10 ekv.) DMA tirpale ir prijungimas vykdomas 1 - 2 valandas.

15 e) N- α -Boc grupės visiškai pašalinamos ($\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), gaunamas 4 darinys, įvedama izonikotiniolo (iNOC) apsauginė grupė, kaip aprašyta aukščiau (4), maišant su 4-izonikotinil-2-4-dinitrofenilkarbonatu (3 ekv.) ir NMM (6 ekv.) DMA tirpale 25°C temperatūroje 24 valandas.

f) Peptidas atskeliamas nuo matricos ir nuimamas blokavimo grupės, paveikiant bevandeniu HF (5 % anizolo/5 % etilmetilsulfido) 0°C temperatūroje 1 valandą. Gaunamas iNOC-apsaugotas, glikolat-lys-amid aktyvuotas peptidas 5, kuris išgryninamas C18 atvirkščių fazių HPLC ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradientas, 0,1 % TFA). Visų gautų fragmentų tapatumas buvo tikrinamas masės spektrometrija.

30

Pateiktas išradimas gali būti atkartotas, remiantis aukščiau pateiktu aprašymu ir prieinamomis publikacijomis ir pradinėmis medžiagomis. Be to pareiškėjo atidavė saugoti American Type Culture Collection (ATCC) muziejui, esančiam Rockville, Md., USA, lastelių linijas, išvardytas žemiau:

35

Escherichia coli, DH10B-pBSK-hm^{pl}I 1.8, ATCC saugojimo Nr. CRL 69575, priimtas saugojimui 1994 m. vasario mėn. 24 d.

Plazmidė pSVI.ID.LL.MLORF, ATCC saugojimo
5 Nr. CRL 75958, priimta saugojimui 1994 m. gruodžio mėn. 2 d. ir

CHO DP-12 ląstelės, ML 1/50 MCB (pažymėtos Nr. 1594), ATCC saugojimo Nr. CRL 11770, priimtose saugojimui 1994 m. gruodžio mėn. 6 d.

10 Šis muziejus buvo sudarytas pagal Budapešto Sutartį, reguliuojančią Tarptautinės Mikroorganizmų Muziejų Sudarymo taisykles patentavimo tikslams, ir atitinkamus poįstatyminius aktus. Tai užtikrina gyvybingų kultūrų palaikymą 30 metų nuo priėmimo saugojimui datos. Mikro-
15 organizmai gali būti paimami iš ATCC pagal tvarką, nurodytą Budapešto Sutartyje, ir yra susitarimo objektas tarp pateikėjo ir ATCC, kuris garantuoja neribotą galimybę naudotis kultūromis, nepažeidžiant JAV patento. Galimybė naudotis saugomomis kultūromis nereiškia
20 teisės naudoti šį išradimą, pažeidžiant patento savininko teises, kurios yra garantuojamos kiekvienos Vyriausybės pagal jos Patentų įstatymus.

* * * * *

25 Kadangi aprašant išradimą būtina pateikti geriausius išradimo įgyvendinimo būdus ir konkrečius darbinis pavyzdžius, tai kiekvienas eilinis specialistas, perskaitęs šį aprašymą, galės padaryti įvairius pakeitimus, naudoti medžiagų analogus, ir kitaip
30 pakeisti išradimą, nepakeičiant esmės. Tai yra, šis išradimas gali būti panaudojamas kitaip, nei čia aprašyta. Todėl laikoma, kad patentu suteikiama apsauga ribojama išradimo apibrėžtimi, taikant ekvivalentus.

SEKOS

(1) PAGRINDINĖ INFORMACIJA:

- (i) PATEIKĖJAS: Eaton, Dan L.
de Sauvage, Federic J.
- (ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS: TROMBOPOETINAS
- (iii) Sekų skaičius: 144
- (iv) ADRESAS SUSIRAŠINĖJIMUI:
 - (A) ADRESAS: Genentech, Inc.
 - (B) GATVĖ: 460 Point San Bruno Blvd
 - (C) MIESTAS: South San Francisco
 - (D) VALSTIJA: Kalifornija
 - (E) ŠALIS: JAV
 - (F) KODAS: 94080
- (v) KOMPIUTERINĖ VERSIJA:
 - (A) NEŠIKLIS: 3,5 colio, 1.44Mb lankstūs laikmenys.
 - (B) KOMPIUTERIS: IBM PC suderinamas
 - (C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: WinPatin (Genentech)
- (vi) PASKUTINIO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/374540
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1995.01.18
 - (C) KLASIFIKACIJA:
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: PCT/US94/14553
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.12.28
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/249376
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.05.25
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/223263
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.04.04
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/196689
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.02.15
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/348658
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.12.02
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/185607
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.01.21
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/348657
 - (B) UŽPILDYMO DATA: 1994.12.02
- (vii) ANKSTESNIOJO PATEIKIMO DUOMENYS:
 - (A) PATEIKIMO Nr.: 08/176553

(B) UŽPILDYMO DATA: 1994.01.03

(viii) INFORMACIJA APIE PATIKĖTINĮ/AGENTĄ:

(A) PAVARDĖ: Winter, Daryl B.

(B) REGISTRACIJOS Nr.: 32,637

(C) NUORODOS/APRAŠO Nr.: P0871P5

(ix) TELEKOMUNIKACINĖ INFORMACIJA:

(A) TELEFONAS: 415/225-1249

(B) TELEFAKSAS: 415/952-9881

(C) TELEKSAS: 910/371-7168

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 1:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 353 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 1:

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr
-21 -20 -15 -10

Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu
-5 1 5

Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser
10 15 20

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val
25 30 35

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
40 45 50

Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
55 60 65

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
70 75 80

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu
85 90 95

Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro
100 105 110

Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu
115 120 125

Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
 130 135 140
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr
 145 150 155
 Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
 160 165 170
 Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser
 175 180 185
 Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe
 190 195 200
 Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 205 210 215
 Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn
 220 225 230
 Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly
 235 240 245
 Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro
 250 255 260
 Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro
 265 270 275
 Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr
 280 285 290
 Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro
 295 300 305
 Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His
 310 315 320
 Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 325 330 332

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 2:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 1795 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 2:

TCTTCCTACC CATCTGCTCC CCAGAGGGCT GCCTGCTGTG CACTTGGGTC 50

TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG 707

Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	
				135					140				
CTT	GTA	GGA	GGG	TCC	ACC	CTC	TGC	GTC	AGG	CGG	GCC	CCA	746
Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	
	145					150					155		
CCC	ACC	ACA	GCT	GTC	CCC	AGC	AGA	ACC	TCT	CTA	GTC	CTC	785
Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	
			160					165					
ACA	CTG	AAC	GAG	CTC	CCA	AAC	AGG	ACT	TCT	GGA	TTG	TTG	824
Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	
170					175					180			
GAG	ACA	AAC	TTC	ACT	GCC	TCA	GCC	AGA	ACT	ACT	GGC	TCT	863
Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	
		185					190					195	
GGG	CTT	CTG	AAG	TGG	CAG	CAG	GGA	TTC	AGA	GCC	AAG	ATT	902
Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	
				200					205				
CCT	GGT	CTG	CTG	AAC	CAA	ACC	TCC	AGG	TCC	CTG	GAC	CAA	941
Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	
	210					215					220		
ATC	CCC	GGA	TAC	CTG	AAC	AGG	ATA	CAC	GAA	CTC	TTG	AAT	980
Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn	
			225					230					
GGA	ACT	CGT	GGA	CTC	TTT	CCT	GGA	CCC	TCA	CGC	AGG	ACC	1019
Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Arg	Thr	
235					240					245			
CTA	GGA	GCC	CCG	GAC	ATT	TCC	TCA	GGA	ACA	TCA	GAC	ACA	1058
Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	
		250					255					260	
GGC	TCC	CTG	CCA	CCC	AAC	CTC	CAG	CCT	GGA	TAT	TCT	CCT	1097
Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	
				265					270				
TCC	CCA	ACC	CAT	CCT	CCT	ACT	GGA	CAG	TAT	ACG	CTC	TTC	1136
Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	
	275					280					285		
CCT	CTT	CCA	CCC	ACC	TTG	CCC	ACC	CCT	GTG	GTC	CAG	CTC	1175
Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Leu	
			290					295					
CAC	CCC	CTG	CTT	CCT	GAC	CCT	TCT	GCT	CCA	ACG	CCC	ACC	1214
His	Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	
300					305					310			

CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC TAC ACC CAC TCC 1253
 Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser
 315 320 325

CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG T AAGGT TCTCAGACAC 1290
 Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 330 332

TGCCGACATC AGCATTGTCT CATGTACAGC TCCCTTCCCT GCAGGGCGCC 1340
 CCTGGGAGAC AACTGGACAA GATTTCCTAC TTTCTCCTGA AACCCAAAGC 1390
 CCTGGTAAAA GGGATACACA GGAAGTAAAA GGGAATCATT TTTCACCTGTA 1440
 CATTATAAAC CTTCAGAAGC TATTTTTTTTA AGCTATCAGC AATACTCATC 1490
 AGAGCAGCTA GCTCTTTGGT CTATTTTCTG CAGAAATTTG CAACTCACTG 1540
 ATTCTCTACA TGCTCTTTTT CTGTGATAAC TCTGCAAAGG CCTGGGCTGG 1590
 CCTGGCAGTT GAACAGAGGG AGAGACTAAC CTTGAGTCAG AAAACAGAGA 1640
 AAGGGTAATT TCCTTTGCTT CAAATTCAAG GCCTTCCAAC GCCCCCATCC 1690
 CCTTTACTAT CATTCTCAGT GGGACTCTGA TCCCATATTC TTAACAGATC 1740
 TTTACTCTTG AGAAATGAAT AAGCTTTCTC TCAGAAAAAA AAAAAAAAAA 1790
 AAAAA 1795

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 3:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 42 amino rūgščių liekanos
- (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
- (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 3:

Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu
 -16 -15 -10 -5

Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys
 1 5 10

Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu
 15 20 25 26

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 4:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 390 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 4:

GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT 50

CACCTCTCCT	CATCTAAGAA	TTG	CTC	CTC	GTG	GTC	ATG	CTT	91
		Leu	Leu	Leu	Val	Val	Met	Leu	
		-16	-15					-10	

CTC	CTA	ACT	GCA	AGG	CTA	ACG	CTG	TCC	AGC	CCG	GCT	CCT	130
Leu	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	
			-5						1				

CCT	GCT	TGT	GAC	CTC	CGA	GTC	CTC	AGT	AAA	CTG	CTT	CGT	169
Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	
5					10					15			

GAC	TCC	CAT	GTC	CTT	CAC	AGC	AGA	CTG	GTGA	GA	ACTCCCAA	210
Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu				
		20					25	26				

CATTATCCCC TTTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA 260

GACACCATCA CTCCTCTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT TCTTCCCAT 310

TTGTCCCCAC CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT 360

ACAGCCCGCA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA 390

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 5:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 390 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 5:

TCTAGACGAG AGCTTTTAAA TGCGGGCTGT ATTGTGAAGA ATAATTCTTG 50

TCAGAGAGTG TGATCAGTAG GTGGGGACAA TATGGGAAGA ATAGTCATTG 100

GGTCAAGGAG TTAGAGGAAG TGATGGTGTC TTCCTGGGAG TATGGGTGTC 150

TTACCAGTTA CGCGGATAAA GGGGATAATG TTGGGAGTTC TCACCAGTCT 200

GCTGTGAAGG ACATGGGAGT CACGAAGCAG TTTACTGAGG ACTCGGAGGT 250

CACAAGCAGG AGGAGCCGGG CTGGACAGCG TTAGCCTTGC AGTTAGGAGA 300

AGCATGACCA CGAGGAGCAA TTCTTAGATG AGGAGAGGTG AGGTTGAAAG 350

ATGAGGAGGA AATCATTGTC AGCTGGTATT CCAGGAATTC 390

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 6:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 332 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) GRADIŠKUMAS: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 6:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	1	5	10	15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	20	25	30	
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	35	40	45	
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	50	55	60	
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	65	70	75	
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80	85	90	
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105	
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	110	115	120	
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	125	130	135	
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	140	145	150	
Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	155	160	165	
Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	170	175	180	
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	185	190	195	
Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	200	205	210	
Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	215	220	225	
Leu	Asn	Arg	Ile	His	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe				

	230		235		240
Pro Gly Pro Ser	Arg Arg Thr Leu Gly	Ala Pro Asp Ile Ser Ser			
	245	250		255	
Gly Thr Ser Asp	Thr Gly Ser Leu Pro	Pro Asn Leu Gln Pro Gly			
	260	265		270	
Tyr Ser Pro Ser	Pro Thr His Pro Pro	Thr Gly Gln Tyr Thr Leu			
	275	280		285	
Phe Pro Leu Pro	Pro Thr Leu Pro Thr	Pro Val Val Gln Leu His			
	290	295		300	
Pro Leu Leu Pro	Asp Pro Ser Ala Pro	Thr Pro Thr Pro Thr Ser			
	305	310		315	
Pro Leu Leu Asn	Thr Ser Tyr Thr His	Ser Gln Asn Leu Ser Gln			
	320	325		330	
Glu Gly					
332					

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 7:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 166 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 7:

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr			
1	5	10	15
Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala			
	20	25	30
Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys			
	35	40	45
Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala			
	50	55	60
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu			
	65	70	75
Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro			
	80	85	90
Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu			
	95	100	105
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser			
	110	115	120

Arg
166

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Ser | Pro | Ala | Pro | Pro | Ala | Cys | Asp | Leu | Arg | Val | Leu | Ser | Lys | Leu | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu | Arg | Asp | Ser | His | Val | Leu | His | Ser | Arg | Leu | Ser | Gln | Cys | Pro | 20 | 25 | 30 | |
| Glu | Val | His | Pro | Leu | Pro | Thr | Pro | Val | Leu | Leu | Pro | Ala | Val | Asp | 35 | 40 | 45 | |
| Phe | Ser | Leu | Gly | Glu | Trp | Lys | Thr | Gln | Met | Glu | Glu | Thr | Lys | Ala | 50 | 55 | 60 | |
| Gln | Asp | Ile | Leu | Gly | Ala | Val | Thr | Leu | Leu | Leu | Glu | Gly | Val | Met | 65 | 70 | 75 | |
| Ala | Ala | Arg | Gly | Gln | Leu | Gly | Pro | Thr | Cys | Leu | Ser | Ser | Leu | Leu | 80 | 85 | 90 | |
| Gly | Gln | Leu | Ser | Gly | Gln | Val | Arg | Leu | Leu | Leu | Gly | Ala | Leu | Gln | 95 | 100 | 105 | |
| Ser | Leu | Leu | Gly | Thr | Gln | Gly | Arg | Thr | Thr | Ala | His | Lys | Asp | Pro | 110 | 115 | 120 | |
| Asn | Ala | Ile | Phe | Leu | Ser | Phe | Gln | His | Leu | Leu | Arg | Gly | Lys | Val | 125 | 130 | 135 | |
| Arg | Phe | Leu | Met | Leu | Val | Gly | Gly | Ser | Thr | Leu | Cys | Val | Arg | Arg | 140 | 145 | 150 | |
| Ala | Pro | Pro | Thr | Thr | Ala | Val | Pro | Ser | Arg | Thr | Ser | Leu | Val | Leu | 155 | 160 | 165 | |
| Thr | Leu | Asn | Glu | Leu | Pro | Asn | Arg | Thr | Ser | Gly | Leu | Leu | Glu | Thr | | | | |

170										175					180				
Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys					
				185					190					195					
Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln					
				200					205					210					
Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile					
				215					220					225					
His	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser					
				230					235					240					
Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp					
				245					250					255					
Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ser					
				260					265					270					
Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Pro					
				275					280					285					
Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro					
				290					295					300					
Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn					
				305					310					315					
Thr	Ser	Tyr	Thr	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly							
				320					325			328							

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 9:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 265 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 9:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu			
1				5					10					15			
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro			
				20					25					30			
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp			
				35					40					45			
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala			
				50					55					60			
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met			
				65					70					75			

Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80	85	90
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	110	115	120
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	125	130	135
Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Trp	Ile	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	His	Cys	Leu	140	145	150
Ser	Gln	Asn	Tyr	Trp	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	155	160	165
Gln	Ser	Gln	Asp	Ser	Trp	Ser	Ala	Glu	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Pro	170	175	180
Gly	Pro	Asn	Pro	Arg	Ile	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	185	190	195
Trp	Asn	Ser	Trp	Thr	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Arg	200	205	210
Ser	Pro	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Ile	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Ala	215	220	225
Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Trp	Ile	Phe	Ser	Phe	Pro	Asn	Pro	Ser	Ser	230	235	240
Tyr	Trp	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Ala	His	245	250	255
Pro	Cys	Gly	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser						260	265	

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 10:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 261 amino rūgščių liekanos
- (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
- (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 10:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	1	5	10	15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	20	25	30	
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp				

										35											40											45
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	50				55								60					
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	65				70								75					
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80				85								90					
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95				100								105					
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	110				115								120					
Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Asp	125				130								135					
Phe	Trp	Ile	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	His	Cys	Leu	Ser	Gln	Asn	Tyr	140				145								150					
Trp	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Gln	Ser	Gln	Asp	155				160								165					
Ser	Trp	Ser	Ala	Glu	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Pro	Gly	Pro	Asn	Pro	170				175								180					
Arg	Ile	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Asn	Ser	Trp	185				190								195					
Thr	Leu	Ser	Trp	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	His	200				205								210					
Phe	Leu	Arg	Asn	Ile	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Pro	215				220								225					
Ala	Trp	Ile	Phe	Ser	Phe	Pro	Asn	Pro	Ser	Ser	Tyr	Trp	Thr	Val	230				235								240					
Tyr	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Ala	His	Pro	Cys	Gly	Pro	245				250								255					
Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser										260	261																

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 11:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 7849 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 11:

CCCAGCCTCC TTTCTCTTGT TCCCTGGTCA TGCCTGCCTC CCTGTCTCCT 50
GTCTCTCCCT CCCACACACA CCCACTATCC TCCCAGCTAT CCCTACACCC 100
TCCTTCCTAA TCTTGGGAGA CATCTCGTCT GGCTGGACGG GAAAATTCCA 150
GGATCTAGGC CACACTTCTC AGCAGACATG CCCATCCTTG GGGAGGAGGA 200
ACAGGAGAGA GCCTGAGGAA GTTCTGGGGG ACAGGGGGAT GATGGGATCA 250
AGGTCAGGCC AGGAAGCCCC TGAGGACAGA GACTGTGGGG AGACTGGGAC 300
TGGAAGAAA GCAAAGGAGC TAGAGCCAGG GCCAAAGGAA AAGGGGGGCC 350
AGCAGGGAGG TATTTGCGGG GGAGGTCCAG CAGCTGTCTT TCCTAAGACA 400
GGGACACATG GGCCTGGTTA TTCCTCTTGT CACATGTGGA ACGGTAGGAG 450
ATGGAAGACG GAGACAGAAC AAGCAAAGGA GGGCCCTGGG CACAGAGGTC 500
TGTGTGTGTA GCCATCCAAG CCACTGGACC CCAGCAGACG AGCACCTAAG 550
CTCAGGCTTA ACCCAGTGCA CGTGTGCGCA CATACTGTG CCCCGCACCT 600
GACAGTCCAC TCAACCCGTC CAAACCCTTT CCCATAACA CCAACCCATA 650
ACAGGAGATT TCTCTCATGT GGGCAATATC CGTGTTCCTA CTTGAAAGG 700
GGGAATGACA AGATAGGACT CCCTAGGGGA TTACAGAAAG AAAAGCAGGA 750
AAGCAAGCAT CCTGTTGGAT TTCAGCAGCA GGTATGATGT CCAGGGAAAA 800
GAAATTTGGA TAGCCAGGGA GTGAAAACCC CACCAATCTT AAACAAGACC 850
TCTGTGCTTC TTCCCCAGCA ACACAAATGT CCTGCCAGAT TCCTCCTGGA 900
AAAAAACTTC TGCTCCTGTC CCCCTCCAGG TCCCAGGTTG CCCATGTCCA 950
GGAAAAGATG GATCCCCCTA TCCAAATCTT CTCCGTGGTG TGTGTGGGTG 1000
GAGGAGTGGA CCCTGGTCCA GGCAGGGGCT CCAGGGAAGA GAAGGCGTCA 1050
CTTCCGGGGG CCTTCACCAG TGTCTGGTGG CTCCCTTCTC TGATTGGGCA 1100
GAAGTGGCCC AGGCAGGCGT ATGACCTGCT GCTGTGGAGG GGCTGTGCCC 1150
CACCGCCACA TGTCTTCCTA CCCATCTGCT CCCAGAGGG CTGCCTGCTG 1200
TGCACTTGGG TCCTGGAGCC CTTCTCCACC CGGTGAGTGG CCAGCAGGGT 1250
GTGGGGTTAT GTGAGGGTAG AAAGGACAGC AAAGAGAAAT GGGCTCCCAG 1300

CTGGGGGAGG GGCAGGCAAA CTGGAACCTA CAGGCACTGA CCTTTGTCGA 1350
 GAAGAGTGTA GCCTTCCCAG AATGGGAGGA GCAGGGCAGA GCAGGGGTAG 1400
 GGGGTGGGGT GCTGGTTTCT GAGGGACTGA TCACTTACTT GGTGGAATAC 1450
 AGCACAGCCC TGGCTGGCCC TAAGGAAAGG GGACATGAGC CCAGGGAGAA 1500
 AATAAGAGAG GGAGCTGCAC TTAGGGCTTA GCAAACACAG TAGTAAGATG 1550
 GACACAGCCC CAATCCCCAT TCTTAGCTGG TCATTCTCG TTAGCTTAAG 1600
 GTTCTGAATC TGGTGCTGGG GAAGCTGGGC CAGGCAAGCC AGGGCGCAAG 1650
 GAGAGGGTAA TGGGAGGAGG GCCCACTCAT GTTGACAGAC CTACAGGAAA 1700
 TCCCAATATT GAATCAGGTG CAAGCCTCTT TGCACAACCT GTGAAAGGAG 1750
 GAGGAAGCCA TGTGGGGGGT CCTGTGAAGG AACCGGAAGG GGTTCGCCA 1800
 AGGGGGCAGG GAGGCAGGTG TGAGCTATGA GACAGATATG TTAGTGGGCG 1850
 CCTAAGACAA GGTAAGCCCC TAAGGTGGGC ATCACCAGC AGGTGCCCCT 1900
 TCCTGGGCAG CTGGTCTCAG GAAGGAAGTC CCAGAACTGT TAGCCCATCT 1950
 CTTGGCCTCA GATAATGGAG TATTTAGGA CTTGGAGTCC AAAGAAAAGC 2000
 TCCAGTGGCT TTATGTGTGG GGGTAGATAG GGAAAGAATA GAGGTTAATT 2050
 TCTCCCATAC CGCCTTTTAA TCCTGACCTC TAGTGGTCCC AGTTACAGCT 2100
 TTGTGCAGTT CCCCTCCCCA GCCCCACTCC CCACCGCAGA AGTTACCCCT 2150
 CAACATATTG CGCCCGTTTG CCAGTTCCTC ACCCAGGCCC TGCATCCCAT 2200
 TTTCCACTCT CTTCTCCAGG CTGAAGCCAC AATACTTTCC TTCTCTATCC 2250
 CCATCCCAGA TTTTCTCTGA CCTAACAACC AAGGTTGCTC AGAATTTAAG 2300
 GCTAATTAAG ATATGTGTGT ATACATATCA TGTCTGCTG CTCTCAGCAG 2350
 GGGTAGGTGG CACCAAATCC GTGTCCGATT CACTGAGGAG TCCTGACAAA 2400
 AAGGAGACAC CATATGCTTT CTTGCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTTT 2450
 TTTTTTTTGA GACGGAGTTT CACTCTTATT GCCCAGGCTG GAGTGCAATG 2500
 GTGCGATCTC GGCTCACCAC AAACCTCCGC CTCCCAGGTA CAAGCGATTC 2550
 TCCTGTCTCA GCCTCCCAAG TAGCTTGGAT TACAGGCATG AGCCACCACA 2600
 CCCTGCTAGT TTTTTTGTAT TTCGTAGAGC CGGGGTTTCA CCATGTTAGT 2650
 GAGGCTGGTG GCGAACTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTTGGACTC 2700

CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCATGAGCCA CTGCACCCGG CACACCATAT 2750
GCTTTCATCA CAAGAAAATG TGAGAGAATT CAGGGCTTTG GCAGTTCCAG 2800
GCTGGTCAGC ATCTCAAGCC CTCCCCAGCA TCTGTTACC CTGCCAGGCA 2850
GTCTCTTCCT AGAAACTTGG TTAAATGTTT ACTCTTCTTG CTACTTTCAG 2900
GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG CCCCACCTTA CTCTGCCCAG 2950
AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA 3000
GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA GACACCCCGG CCAGAATGGA 3050
GCTGACTGGT GAGAACACAC CTGAGGGGCT AGGGCCATAT GGAAACATGA 3100
CAGAAGGGGA GAGAGAAAGG AGACACGCTG CAGGGGGCAG GAAGCTGGGG 3150
GAACCCATTC TCCCAAAAAT AAGGGGTCTG AGGGGTGGAT TCCCTGGGTT 3200
TCAGGTCTGG GTCCTGAATG GGAATTCCTG GAATACCAGC TGACAATGAT 3250
TTCCTCCTCA TCTTTCAACC TCACCTCTCC TCATCTAAGA ATTGCTCCTC 3300
GTGGTCATGC TTCTCCTAAC TGCAAGGCTA ACGCTGTCCA GCCCGGCTCC 3350
TCCTGCTTGT GACCTCCGAG TCCTCAGTAA ACTGCTTCGT GACTCCCATG 3400
TCCTTCACAG CAGACTGGTG AGAACTCCCA ACATTATCCC CTTTATCCGC 3450
GTAAGTGGTA AGACACCCAT ACTCCCAGGA AGACACCATC ACTTCTCTA 3500
ACTCCTTGAC CCAATGACTA TTCTTCCCAT ATTGTCCCCA CCTACTGATC 3550
ACACTCTCTG ACAAGAATTA TTCTTCACAA TACAGCCCGC ATTTAAAGC 3600
TCTCGTCTAG AGATAGTACT CATGGAGGAC TAGCCTGCTT ATTAGGCTAC 3650
CATAGCTCTC TCTATTTTCA CTCCCTTCTC CCCCCACCA TCTTTTTTCAA 3700
CAGAGCCAGT GCCCAGAGGT TCACCCTTTG CCTACACCTG TCCTGCTGCC 3750
TGCTGTGGAC TTTAGCTTGG GAGAATGGAA AACCCAGATG GTAAGAAAGC 3800
CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT CCCACTGCTT 3850
CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAAATAT CTCACCTTCA 3900
GCTTGGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG 3950
ATAAGATGAT GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTT GAAGCTGAAC 4000
ACCATGAAAA GCTGGAGAGA AATCGCTCAT GGCCATGCCT TTGACCTATT 4050
CCYGTTTCAGT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG AAGCAAGACT CATATGTCAT 4100

CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC AAAAGACTGA 4150
 ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC 4200
 AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAATCCCA 4250
 GCACTTTGGG AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG 4300
 AGCAGCCTGG CCAACATGGC GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAAAAT 4350
 TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT CCCAGCTACT TGGAAGGCTG 4400
 AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA GTGAGCTGAG 4450
 ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA 4500
 AAAAGAAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC 4550
 CAGCTTTCAG GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT 4600
 AGCACTTCCT ACGAAAAGGA TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA 4650
 CCATGTAACA TTA CTGAAGC TGCTATTCTT AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT 4700
 GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGAAA TGCTCGTACA GAACTCTATT 4750
 CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 4800
 GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAAC TAACATGTGT 4850
 CTAGAAAGCA GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG 4900
 CAATAGTTTA AAAA ACTAAA ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTTC 4950
 TTCCTTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG CAGTTCCTAT GGGTCCCTTC 5000
 TAGTCCTTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT CTCATACCTA 5050
 CATTTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 5100
 CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC 5150
 CCGGATTCAA GCGATTCTCC TGCCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC 5200
 AGGTGCCCAC CACCATGCCC AGCTAATTTT TGTATTTTGT GTAGAGATGG 5250
 GGTTCACCA TGTTGGCCAG GCTGATCTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT 5300
 CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACTG 5350
 CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG 5400
 CAGAAAGAGT AAATTTGCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA 5450
 GGGCAGATTT CAGCAACGTA AGAAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA 5500

AGTGTAAGAC CAGGCTGGAC TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG 5550
CTGATGACCA GCTGTCGGGA GACTGTGAAG GAATTCCTGC CCTGGGTGGG 5600
ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCACTC TGCTGGCTAC 5650
TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTTGAGG CAGTGCCTT 5700
CTCTCTTCCA TCTCTTTCTC AGGAGGAGAC CAAGGCACAG GACATTCTGG 5750
GAGCAGTGAC CCTTCTGCTG GAGGGAGTGA TGGCAGCACG GGGACAACTG 5800
GGACCCACTT GCCTCTCATC CCTCCTGGGG CAGCTTTCTG GACAGGTCCG 5850
TCTCCTCCTT GGGGCCCTGC AGAGCCTCCT TGGAACCCAG GTAAGTCCCC 5900
AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCACTAGAA 5950
GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG 6000
ATCTACTAAG AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC 6050
TGTCTTTCCT ACTTAGACAA GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG 6100
GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAGCTTC CTCCACAGGG CAGGACCA 6150
GCTCACAAGG ATCCCAATGC CATCTTCCTG AGTTTCCAAC ACCTGCTCCG 6200
AGGAAAGGTG CGTTTCCTGA TGCTTGTAGG AGGGTCCACC CTCTGCGTCA 6250
GGCGGGCCCC ACCCACCACA GCTGTCCCCA GCAGAACCTC TCTAGTCCTC 6300
ACACTGAACG AGCTCCCAAA CAGGACTTCT GGATTGTTGG AGACAACTT 6350
CACTGCCTCA GCCAGAATA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG TGGCAGCAGG 6400
GATTCAGAGC CAAGATTCCT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGGTCCCTG 6450
GACCAAATCC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC 6500
TCGTGGACTC TTTCTGGAC CCTCACGCAG GACCCTAGGA GCCCCGGACA 6550
TTTCTCAGG AACATCAGAC ACAGGCTCCC TGCCACCCAA CCTCCAGCCT 6600
GGATATTCTC CTTCCCCAAC CCATCCTCCT ACTGGACAGT ATACGCTCTT 6650
CCCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCCTGT GGTCCAGCTC CACCCCTGC 6700
TTCCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC 6750
ACATCCTACA CCCACTCCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AAGGTTCTCA 6800
GAACTGCCG ACATCAGCAT TGTCTCATGT ACAGCTCCCT TCCCTGCAGG 6850
GCGCCCCTGG GAGACAACTG GACAAGATTT CTACTTTCT CCTGAAACCC 6900

AAAGCCCTGG TAAAAGGGAT ACACAGGACT GAAAAGGGAA TCATTTTTC 6950
 CTGTACATTA TAAACCTTCA GAAGCTATTT TTTTAAGCTA TCAGCAATAC 7000
 TCATCAGAGC AGCTAGCTCT TTGGTCTATT TTCTGCAGAA ATTTGCAACT 7050
 CACTGATTCT CTACATGCTC TTTTCTGTG ATAACCTCTGC AAAGGCCTGG 7100
 GCTGGCCTGG CAGTTGAACA GAGGGAGAGA CTAACCTTGA GTCAGAAAAC 7150
 AGAGAAAGGG TAATTTCCCTT TGCTTCAAAT TCAAGGCCTT CCAACGCCCC 7200
 CATCCCCTTT ACTATCATTC TCAGTGGGAC TCTGATCCCA TATTCTTAAC 7250
 AGATCTTTAC TCTTGAGAAA TGAATAAGCT TTCTCTCAGA AATGCTGTCC 7300
 CTATACACTA GACAAACTG AGCCTGTATA AGGAATAAAT GGGAGCGCCG 7350
 AAAAGCTCCC TAAAAAGCAA GGGAAAGATG TTCTTCGAGG GTGGCAATAG 7400
 ATCCCCCTCA CCCTGCCACC CCAAACAAA AAGCTAACAG GAAGCCTTGG 7450
 AGAGCCTCAC ACCCCAGGTA AGGCTGTGTA GACAGTTCAG TAAAGACAGG 7500
 ACCTGGATGT GACAGCTGAG CAAACAGCTA GAGCTTTGGC AGCTCAGCAG 7550
 GAGGCTTTGC CAGGCATGGA CGCCTGCCTC CCTCCTGTGG AGGTCAGGAG 7600
 GAAGTGCAGG AAGTGGCATG AGTCAGGCTC CTTGAGCTCA CACAGCAGGA 7650
 GAACAAGTAC AAGTCAAGTA CAAGTTGAAG GCTCATTTCC CAGTTCCCGC 7700
 AAATGCATCT AAAAAGCAGC TCTGTGTGAC CACCATAAAC TCTGCTAGGG 7750
 GATCTCTAAA AAGGAGTCAG GCTTATGGGG CTTTGCAAAT AAGTGCTGCC 7800
 TTGGTGCTCA GGAAAAGGTT TGTGTTGCAC AAAACACAAA TTCCACTGC 7849

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 12:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 1443 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 12:

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50
 AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTGAGGG GAGAGGCCCC 100
 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGA ATG GAG 143
 Met Glu

CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT GCA GTG 182
Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val
-15 -10

GAC CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC 260
Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His
10 15 20

CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT 338
Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
35 40 45

AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA CAG AGC AAG 377
Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys :
50 55

GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG 416
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu
60 65 70

GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC 455
Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys
75 80 85

CTC TCA TCC CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC 494
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg
90 95

CTC CTC TTG GGG GCC CTG CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG 533
Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln
100 105 110

GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAC CCC AAT GCC CTC TTC 572
Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe
115 120

TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG GGA AAG GTG CGC TTC 611
Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe
125 130 135

CTG	CTT	CTG	GTA	GAA	GGT	CCC	ACC	CTC	TGT	GTC	AGA	CGG	650
Leu	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	
		140					145					150	

ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC AGT ACT TCT CAA 689

Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln		
				155					160					
CTC	CTC	ACA	CTA	AAC	AAG	TTC	CCA	AAC	AGG	ACT	TCT	GGA	728	
Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly		
	165					170					175			
TTG	TTG	GAG	ACG	AAC	TTC	AGT	GTC	ACA	GCC	AGA	ACT	GCT	767	
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala		
			180					185						
GGC	CCT	GGA	CTT	CTG	AGC	AGG	CTT	CAG	GGA	TTC	AGA	GTC	806	
Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe	Arg	Val		
190					195					200				
AAG	ATT	ACT	CCT	GGT	CAG	CTA	AAT	CAA	ACC	TCC	AGG	TCC	845	
Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser		
		205					210					215		
CCA	GTC	CAA	ATC	TCT	GGA	TAC	CTG	AAC	AGG	ACA	CAC	GGA	884	
Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly		
				220					225					
CCT	GTG	AAT	GGA	ACT	CAT	GGG	CTC	TTT	GCT	GGA	ACC	TCA	923	
Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser		
	230					235					240			
CTT	CAG	ACC	CTG	GAA	GCC	TCA	GAC	ATC	TCG	CCC	GGA	GCT	962	
Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala		
			245					250						
TTC	AAC	AAA	GGC	TCC	CTG	GCA	TTC	AAC	CTC	CAG	GGT	GGA	1001	
Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Gly		
255					260					265				
CTT	CCT	CCT	TCT	CCA	AGC	CTT	GCT	CCT	GAT	GGA	CAC	ACA	1040	
Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	His	Thr		
		270					275					280		
CCC	TTC	CCT	CCT	TCA	CCT	GCC	TTG	CCC	ACC	ACC	CAT	GGA	1079	
Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	His	Gly		
				285					290					
TCT	CCA	CCC	CAG	CTC	CAC	CCC	CTG	TTT	CCT	GAC	CCT	TCC	1118	
Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro	Ser		
	295					300					305			
ACC	ACC	ATG	CCT	AAC	TCT	ACC	GCC	CCT	CAT	CCA	GTC	ACA	1157	
Thr	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr		
			310					315						
ATG	TAC	CCT	CAT	CCC	AGG	AAT	TTG	TCT	CAG	GAA	ACA	TAGCGC	1199	
Met	Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr			
320					325					330	331			

G GGCACCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC 1240
 AAGCTTCCCC AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT 1290
 GCTTTCACCT AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT 1340
 AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAACT ATCAGCAATA TTCATCAGAG 1390
 CAGCTAGCGA TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT 1440
 TCT 1443

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 13:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 352 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 13:

Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Ala	Val
-21	-20					-15					-10			
Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro
	-5					1				5				
Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Leu	His	Ser
10					15					20				
Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val
25					30					35				
Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln
40					45					50				
Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu
55					60					65				
Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser
70					75					80				
Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu
85					90					95				
Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Thr
100					105					110				
Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln
115					120					125				
Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Pro
130					135					140				
Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser

145		150		155
Ser Thr Ser Gln Leu	Leu Thr Leu Asn Lys	Phe Pro Asn Arg Thr		
160	165	170		
Ser Gly Leu Leu Glu	Thr Asn Phe Ser Val	Thr Ala Arg Thr Ala		
175	180	185		
Gly Pro Gly Leu Leu	Ser Arg Leu Gln Gly	Phe Arg Val Lys Ile		
190	195	200		
Thr Pro Gly Gln Leu	Asn Gln Thr Ser Arg	Ser Pro Val Gln Ile		
205	210	215		
Ser Gly Tyr Leu Asn	Arg Thr His Gly Pro	Val Asn Gly Thr His		
220	225	230		
Gly Leu Phe Ala Gly	Thr Ser Leu Gln Thr	Leu Glu Ala Ser Asp		
235	240	245		
Ile Ser Pro Gly Ala	Phe Asn Lys Gly Ser	Leu Ala Phe Asn Leu		
250	255	260		
Gln Gly Gly Leu Pro	Pro Ser Pro Ser Leu	Ala Pro Asp Gly His		
265	270	275		
Thr Pro Phe Pro Pro	Ser Pro Ala Leu Pro	Thr Thr His Gly Ser		
280	285	290		
Pro Pro Gln Leu His	Pro Leu Phe Pro Asp	Pro Ser Thr Thr Met		
295	300	305		
Pro Asn Ser Thr Ala	Pro His Pro Val Thr	Met Tyr Pro His Pro		
310	315	320		
Arg Asn Leu Ser Gln	Glu Thr			
325	330 331			

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 14:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 1536 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 14:

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50
 AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAGGG GAGAGGCCCC 100
 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGA ATG GAG 143
 Met Glu

-21 -20

CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT GCA GTG 182
 Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Val
 -15 -10

GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT 221
 Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys
 -5 1 5

GAC CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC 260
 Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His
 10 15 20

CTC CTT CAC AGC CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC 299
 Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp
 25 30

CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT 338
 Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
 35 40 45

AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA CAG AGC AAG 377
 Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys
 50 55

GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG 416
 Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu
 60 65 70

GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC 455
 Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys
 75 80 85

CTC TCA TCC CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC 494
 Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg
 90 95

CTC CTC TTG GGG GCC CTG CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG 533
 Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln
 100 105 110

CTT CCT CTA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAC CCC 572
 Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro
 115 120

AAT GCC CTC TTC TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG GGA 611
 Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg Gly
 125 130 135

AAG GTG CGC TTC CTG CTT CTG GTA GAA GGT CCC ACC CTC 650
 Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu
 140 145 150

TGT GTC AGA CGG ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC 689

Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser		
				155					160					
AGT	ACT	TCT	CAA	CTC	CTC	ACA	CTA	AAC	AAG	TTC	CCA	AAC	728	
Ser	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn		
	165					170					175			
AGG	ACT	TCT	GGA	TTG	TTG	GAG	ACG	AAC	TTC	AGT	GTC	ACA	767	
Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr		
			180					185						
GCC	AGA	ACT	GCT	GGC	CCT	GGA	CTT	CTG	AGC	AGG	CTT	CAG	806	
Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln		
190					195					200				
GGA	TTC	AGA	GTC	AAG	ATT	ACT	CCT	GGT	CAG	CTA	AAT	CAA	845	
Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln		
	205						210					215		
ACC	TCC	AGG	TCC	CCA	GTC	CAA	ATC	TCT	GGA	TAC	CTG	AAC	884	
Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn		
				220					225					
AGG	ACA	CAC	GGA	CCT	GTG	AAT	GGA	ACT	CAT	GGG	CTC	TTT	923	
Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Phe		
	230					235					240			
GCT	GGA	ACC	TCA	CTT	CAG	ACC	CTG	GAA	GCC	TCA	GAC	ATC	962	
Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile		
			245					250						
TCG	CCC	GGA	GCT	TTC	AAC	AAA	GGC	TCC	CTG	GCA	TTC	AAC	1001	
Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn		
255					260					265				
CTC	CAG	GGT	GGA	CTT	CCT	CCT	TCT	CCA	AGC	CTT	GCT	CCT	1040	
Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro		
		270					275					280		
GAT	GGA	CAC	ACA	CCC	TTC	CCT	CCT	TCA	CCT	GCC	TTG	CCC	1079	
Asp	Gly	His	Thr	Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro		
				285					290					
ACC	ACC	CAT	GGA	TCT	CCA	CCC	CAG	CTC	CAC	CCC	CTG	TTT	1118	
Thr	Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe		
	295					300					305			
CCT	GAC	CCT	TCC	ACC	ACC	ATG	CCT	AAC	TCT	ACC	GCC	CCT	1157	
Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro		
			310					315						
CAT	CCA	GTC	ACA	ATG	TAC	CCT	CAT	CCC	AGG	AAT	TTG	TCT	1196	
His	Pro	Val	Thr	Met	Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser		
320					325					330				

CAG GAA ACA TAGCG CGGGCACTGG CCCAGTGAGC GTCTGCAGCT 1240
 Gln Glu Thr
 335

TCTCTCGGGG ACAAGCTTCC CCAGGAAGGC TGAGAGGCAG CTGCATCTGC 1290
 TCCAGATGTT CTGCTTTCAC CTAAAAGGCC CTGGGGAAGG GATACACAGC 1340
 ACTGGAGATT GTAAAATTTT AGGAGCTATT TTTTTTTAAC CTATCAGCAA 1390
 TATTCATCAG AGCAGCTAGC GATCTTTGGT CTATTTTCGG TATAAATTTG 1440
 AAAATCACTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1490
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1536

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 15:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 356 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 15:

Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Ala	Val
-21	-20					-15					-10			
Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro
	-5					1				5				
Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Leu	His	Ser
10					15					20				
Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val
25					30					35				
Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln
40					45					50				
Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu
55					60					65				
Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser
70					75					80				
Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu
85					90					95				
Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu
100					105					110				
Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu
115					120					125				

Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu
130					135					140				
Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr
145					150					155				
Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe
160					165					170				
Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr
175					180					185				
Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe
190					195					200				
Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser
205					210					215				
Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val
220					225					230				
Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu
235					240					245				
Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu
250					255					260				
Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala
265					270					275				
Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr
280					285					290				
Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro
295					300					305				
Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr	Met
310					315					320				
Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr				
325					330					335				

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 16:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 241 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 16:

Ser	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu
1				5					10					15

Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro

20										25					30				
Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp					
				35					40					45					
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala					
				50					55					60					
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met					
				65					70					75					
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu					
				80					85					90					
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln					
				95					100					105					
Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala					
				110					115					120					
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu					
				125					130					135					
Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Trp	Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Leu	Gln	Cys	His					
				140					145					150					
Ser	Gln	Asn	Cys	Trp	Pro	Trp	Thr	Ser	Glu	Gln	Ala	Ser	Gly	Ile					
				155					160					165					
Gln	Ser	Gln	Asp	Tyr	Ser	Trp	Ser	Ala	Lys	Ser	Asn	Leu	Gln	Val					
				170					175					180					
Pro	Ser	Pro	Asn	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gln	Asp	Thr	Arg	Thr	Cys					
				185					190					195					
Glu	Trp	Asn	Ser	Trp	Ala	Leu	Cys	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Asp	Pro					
				200					205					210					
Gly	Ser	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Arg	Ser	Phe	Gln	Gln	Arg	Leu	Pro					
				215					220					225					
Gly	Ile	Gln	Pro	Pro	Gly	Trp	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Lys	Pro	Cys					
				230					235					240					

Ser
241

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 17:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 335 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 17:

Ser	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	1	5	10	15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	20	25	30	
Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	35	40	45	
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	50	55	60	
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	65	70	75	
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80	85	90	
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105	
Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	110	115	120	
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	125	130	135	
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	140	145	150	
Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	155	160	165	
Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	170	175	180	
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	185	190	195	
Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	200	205	210	
Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	215	220	225	
Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	230	235	240	
Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	245	250	255	
Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	260	265	270	
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro				

275	280	285
Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr	Thr His Gly Ser Pro Pro	
290	295	300
Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro	Ser Thr Thr Met Pro Asn	
305	310	315
Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met	Tyr Pro His Pro Arg Asn	
320	325	330
Leu Ser Gln Glu Thr		
335		

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 18:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 332 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 18:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu
1				5					10					15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro
			20						25					30
Asp	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp
			35						40					45
Phe	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Ala
			50						55					60
Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Met
			65						70					75
Thr	Ala	Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Pro	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu
			80						85					90
Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln
			95						100					105
Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala
			110						115					120
His	Lys	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu
			125						130					135
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu
			140						145					150
Cys	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr
			155						160					165

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 19:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 1026 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė
(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 19:

AGC	CCG	GCT	CCT	CCT	GCC	TGT	GAC	CCC	CGA	CTC	CTA	36	
Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu		
1				5					10				
AAT	AAA	CTG	CTT	CGT	GAC	TCC	CAT	GTC	CTT	CAC	GGC	AGA	75
Asn	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Gly	Arg	
		15					20					25	

CTG	AGC	CAG	TGC	CCA	GAC	ATT	AAC	CCT	TTG	TCC	ACA	CCT	114
Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	
				30					35				
GTC	CTG	CTG	CCT	GCT	GTG	GAC	TTC	ACC	TTG	GGA	GAA	TGG	153
Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp	
	40					45					50		
AAA	ACC	CAG	ACG	GAG	CAG	ACA	AAG	GCA	CAG	GAT	GTC	CTG	192
Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Val	Leu	
			55					60					
GGA	GCC	ACA	ACC	CTT	CTG	CTG	GAG	GCA	GTG	ATG	ACA	GCA	231
Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Met	Thr	Ala	
	65				70					75			
CGG	GGA	CAA	GTG	GGA	CCC	CCT	TGC	CTC	TCA	TCC	CTG	CTG	270
Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Pro	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	
		80					85					90	
GTG	CAG	CTT	TCT	GGA	CAG	GTT	CGC	CTC	CTC	CTC	GGG	GCC	309
Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	
				95					100				
CTG	CAG	GAC	CTC	CTT	GGA	ATG	CAG	CTT	CCT	CCA	CAG	GGA	348
Leu	Gln	Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	
	105					110					115		
AGG	ACC	ACA	GCT	CAC	AAG	GAT	CCC	AGT	GCC	ATC	TTC	CTG	387
Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	
			120					125					
AAC	TTC	CAA	CAA	CTG	CTC	CGA	GGA	AAG	GTG	CGT	TTC	CTG	426
Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	
	130				135					140			
CTC	CTT	GTA	GTG	GGG	CCC	TCC	CTC	TGT	GCC	AAG	AGG	GCC	465
Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu	Cys	Ala	Lys	Arg	Ala	
		145					150					155	
CCA	CCC	GCC	ATA	GCT	GTC	CCG	AGC	AGC	ACC	TCT	CCA	TTC	504
Pro	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Phe	
				160					165				
CAC	ACA	CTG	AAC	AAG	CTC	CCA	AAC	AGG	ACC	TCT	GGA	TTG	543
His	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	
	170					175					180		
TTG	GAG	ACA	AAC	TCC	AGT	ATC	TCA	GCC	AGA	ACT	ACT	GGC	582
Leu	Glu	Thr	Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	
			185					190					
TCT	GGA	TTT	CTC	AAG	AGG	CTG	CAG	GCA	TTC	AGA	GCC	AAG	621
Ser	Gly	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Lys	
					200					205			

ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTA GAC 660
 Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp 220
 210 215

CAA ATC CCT GGA CAC CAG AAT GGG ACA CAC GGA CCC TTG 699
 Gln Ile Pro Gly His Gln Asn Gly Thr His Gly Pro Leu 230
 225

AGT GGA ATT CAT GGA CTC TTT CCT GGA CCC CAA CCC GGG 738
 Ser Gly Ile His Gly Leu Phe Pro Gly Pro Gln Pro Gly 245
 235 240

GCC CTC GGA GCT CCA GAC ATT CCT CCA GCA ACT TCA GGC 777
 Ala Leu Gly Ala Pro Asp Ile Pro Pro Ala Thr Ser Gly 255
 250

ATG GGC TCC CGG CCA ACC TAC CTC CAG CCT GGA GAG TCT 816
 Met Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly Glu Ser 270
 260 265

CCT TCC CCA GCT CAC CCT TCT CCT GGA CGA TAC ACT CTC 855
 Pro Ser Pro Ala His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu 285
 275 280

TTC TCT CCT TCA CCC ACC TCG CCC TCC CCC ACA GTC CAG 894
 Phe Ser Pro Ser Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln 295
 290

CTC CAG CCT CTG CTT CCT GAC CCC TCT GCG ATC ACA CCC 933
 Leu Gln Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro 310
 300 305

AAC TCT ACC AGT CCT CTT CTA TTT GCA GCT CAC CCT CAT 972
 Asn Ser Thr Ser Pro Leu Leu Phe Ala Ala His Pro His 320
 315

TTC CAG AAC CTG TCT CAG GAA GAG TAAG GTGCTCAGAC 1010
 Phe Gln Asn Leu Ser Gln Glu Glu 332
 325 330

CCTGCCAACT TCAGCA 1026

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 20:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 1014 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 20:

AGC CCG GCT CCT CCT GCC TGT GAC CCC CGA CTC CTA 36
 Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu

1	5	10	
AAT Asn	AAA Lys	CTG Leu 15	CTT Leu 75
CGT Arg	GAC Asp	TCC Ser	CAT His 20
GTC Val	CTT Leu	CAC His	GGC Gly 25
AGA Arg 25			
CTG Leu	AGC Ser	CAG Gln	TGC Cys 30
CCA Pro 30	GAC Asp	ATT Ile	AAC Asn 35
CCT Pro 35	TTG Leu	TCC Ser	ACA Thr 114
CCT Pro 114			
GTC Val 40	CTG Leu 40	CTG Leu	CCT Pro 153
GCT Ala 45	GTG Val 45	GAC Asp 45	TTC Phe 50
ACC Thr 50	TTG Leu 50	GGA Gly 50	GAA Glu 153
TGG Trp 153			
AAA Lys	ACC Thr	CAG Gln	ACG Thr 55
GAG Glu 55	CAG Gln	ACA Thr	AAG Lys 60
GCA Ala 60	CAG Gln	GAT Asp	GTC Val 192
CTG Leu 192			
GGA Gly 65	GCC Ala	ACA Thr	ACC Thr 231
CTT Leu 70	CTG Leu 70	CTG Leu	GAG Glu 75
GCA Ala 75	GTG Val	ATG Met	ACA Thr 231
GCA Ala 231			
CGG Arg	GGA Gly 80	CAA Gln	GTG Val 270
CCC Pro 85	CCT Pro 85	TGC Cys 85	CTC Leu 90
TCA Ser 90	TCC Ser	CTG Leu 90	CTG Leu 270
GTG Val	CAG Gln	CTT Leu	TCT Ser 309
GGA Gly 95	CAG Gln	GTT Val	CGC Arg 100
CTC Leu 100	CTC Leu	CTC Leu	CTC Leu 309
GGG Gly 309	GCC Ala		
CTG Leu 105	CAG Gln	GAC Asp	CTC Leu 348
CTT Leu 110	GGA Gly	ATG Met 110	CAG Gln 115
GGA Gly 115	AGG Arg	ACC Thr	ACA Thr 348
GCT Ala 348			
CAC His	AAG Lys	GAT Asp	CCC Pro 120
AGT Ser 120	GCC Ala	ATC Ile	TTC Phe 125
CTG Leu 125	AAC Asn	TTC Phe	CAA Gln 387
CAA Gln 387			
CTG Leu 130	CTC Leu	CGA Arg	GGA Gly 135
AAG Lys 135	GTG Val	CGT Arg	TTC Phe 140
CTC Leu 140	CTC Leu	CTT Leu	GTA Val 426
GTG Val 426			
GGG Gly	CCC Pro	TCC Ser	CTC Leu 465
TGT Cys 145	GCC Ala	AAG Lys 150	AGG Arg 155
GCC Ala 155	CCA Pro	CCC Pro	GCC Ala 465
ATA Ile 465			
GCT Ala	GTC Val	CCG Pro	AGC Ser 160
ACC Thr 160	TCT Ser	CCA Pro	TTC Phe 165
CAC His 165	ACA Thr	CTG Leu	AAC Asn 504
AAC Asn 504			
AAG Lys	CTC Leu	CCA Pro	AAC Asn 543
AGG Arg 170	ACC Thr	TCT Ser 175	GGA Gly 180
TTG Leu 180	TTG Leu	GAG Glu	ACA Thr 543
AAC Asn 543			
TCC Arg	AGT Ser	ATC Ile	TCA Ser 582
GCC Ala	AGA Arg	ACT Thr	ACT Thr 582
GGC Gly	TCT Ser	GGA Gly	TTT Phe 582
CTC Leu 582			

Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Phe Leu
185 190

AAG AGG CTG CAG GCA TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG 621
Lys Arg Leu Gln Ala Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu
195 200 205

CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTA GAC CAA ATC CCT GGA 660
Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
210 215 220

CAC CAG AAT GGG ACA CAC GGA CCC TTG AGT GGA ATT CAT 699
His Gln Asn Gly Thr His Gly Pro Leu Ser Gly Ile His
225 230

GGA CTC TTT CCT GGA CCC CAA CCC GGG GCC CTC GGA GCT 738
Gly Leu Phe Pro Gly Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gly Ala
235 240 245

CCA GAC ATT CCT CCA GCA ACT TCA GGC ATG GGC TCC CGG 777
Pro Asp Ile Pro Pro Ala Thr Ser Gly Met Gly Ser Arg
250 255

CCA ACC TAC CTC CAG CCT GGA GAG TCT CCT TCC CCA GCT 816
Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly Glu Ser Pro Ser Pro Ala
260 265 270

CAC CCT TCT CCT GGA CGA TAC ACT CTC TTC TCT CCT TCA 855
His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Phe Ser Pro Ser
275 280 285

CCC ACC TCG CCC TCC CCC ACA GTC CAG CTC CAG CCT CTG 894
Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln Leu Gln Pro Leu
290 295

CTT CCT GAC CCC TCT GCG ATC ACA CCC AAC TCT ACC AGT 933
Leu Pro Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro Asn Ser Thr Ser
300 305 310

CCT CTT CTA TTT GCA GCT CAC CCT CAT TTC CAG AAC CTG 972
Pro Leu Leu Phe Ala Ala His Pro His Phe Gln Asn Leu
315 320

TCT CAG GAA GAG TAAGGT GCTCAGACCC TGCCAACTTC 1010
Ser Gln Glu Glu
325 328

AGCA 1014

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 21:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 328 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 21:

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	1	5	10	15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	20	25	30	
Asp	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	35	40	45	
Phe	Thr	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Ala	50	55	60	
Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Met	65	70	75	
Thr	Ala	Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Pro	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	80	85	90	
Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	95	100	105	
Asp	Leu	Leu	Gly	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	110	115	120	
Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	125	130	135	
Arg	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Leu	Cys	Ala	Lys	Arg	140	145	150	
Ala	Pro	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Phe	His	155	160	165	
Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	170	175	180	
Asn	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Phe	Leu	Lys	185	190	195	
Arg	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	200	205	210	
Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	His	Gln	Asn	Gly	Thr	215	220	225	
His	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Ile	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	230	235	240	
Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	245	250	255	
Met	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Leu	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	Ser	260	265	270	

Pro	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Gly	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser
				275					280					285
Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Val	Gln	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro
				290					295					300
Asp	Pro	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Phe
				305					310					315
Ala	Ala	His	Pro	His	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Glu		
				320					325			328		

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 22:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 5141 bazių pora
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: dvigrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 22:

```

TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG 50
GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA 100
GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG 150
TCCQCAGGCT CCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA 200
GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC 250
CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTTTTATT 300
TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG 350
AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG 400
CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA 450
GTACCGCCTA TAGAGCGATA AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT 500
TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAATATG GGGATTGGCA 550
AGAACGGAGA CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC 600
CAAAGAATGA CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAAACAGA ATCTGGTGAT 650
TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC TGAGAAGAAT CGACCTTTAA 700
AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA 750
GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA 800

```


ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA 850
GTTCTGTTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT 900
GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT 950
TGATTTGGGG AAATATAAAC CTCTCCCAGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG 1000
AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG 1050
AAAGACTAAC AGGAAGATGC TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT 1100
ATGCATTTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG 1150
CTTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATACAC 1200
ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA 1250
CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG 1300
GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC 1350
AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC 1400
AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT 1450
CCAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT 1500
CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGGTTAG 1550
GTACCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG 1600
TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA 1650
TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG 1700
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG 1750
CCCCTAACTC CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCCAGTT CCGCCCATTC 1800
TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG 1850
CCTCGGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC 1900
CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG 1950
CGCCATTTAA ATCCTGCAGG TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA 2000
ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG 2050
CACATCCCCC CTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT 2100
CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCCTGATGCG 2150
GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAAA 2200

GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG 2250
TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT 2300
CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCG 2350
TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC 2400
GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTTGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG 2450
CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT 2500
CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATCT 2550
CGGGCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG 2600
TTAAAAAATG AGCTGATTTA AAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT 2650
ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG 2700
CCGCATAGTT AAGCCAACTC CGCTATCGCT ACGTGACTGG GTCATGGCTG 2750
CGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG 2800
CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT 2850
GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCTT 2900
GAAGACGAAA GGGCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG 2950
ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG 3000
CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC 3050
TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG 3100
AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCCT TTTTTCGGC 3150
ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG 3200
ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC 3250
AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT 3300
GATGAGCACT TTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGATG 3350
ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTGCGCGCA TACACTATTC TCAGAATGAC 3400
TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC 3450
AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG 3500
CCAACCTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT 3550
TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACCTCGC CTTGATCGTT GGGGAACCGA 3600

GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG 3650
CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAACCTATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA 3700
GCTTCCCGGC AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG 3750
ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT 3800
CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA 3850
GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC 3900
AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA 3950
TTAAGCATTG GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT 4000
GATTTAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT 4050
TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG 4100
CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT 4150
CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT 4200
GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAC TG 4250
GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG 4300
TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT 4350
GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA 4400
CCGGGTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC 4450
TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC 4500
CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG 4550
AAGGGAGAAA GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA 4600
GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 4650
TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT 4700
CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG 4750
TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC 4800
CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG 4850
CTCGCCGCAG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG 4900
GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGCGTT GGCCGATTCA 4950
TTAATCCAGC TGGCACGACA GGTTCCTCGA CTGGAAAGCG GGCAGTGAGC 5000

GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA 5050
CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 5100
ATTTACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGAATTA A 5141

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 23:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 21 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 23:

ATGTCNCCNG CŅCCNCCNGC N 21

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 24:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 21 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 24:

ATGTCTCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 25:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 21 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 25:

ATGTCGCCTG CTCCACCTGC T 21

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 26:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 21 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 26:

ATGTCGCCAG CGCCACCAGC C 21

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 27:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 21 bazių pora
 (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 27:

ATGTCCCCAG CCCCACCCGC A 21

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 28:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 21 bazių pora
 (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 28:

ATGTCGCCAG CGCCGCCAGC G 21

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 29:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 25 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 29:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg
 20 25

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 30:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 26 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 30:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp Xaa Val Leu His Gly Arg Leu
 20 25 26

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 31:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 25 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 31:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg
 20 25

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 32:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 14 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 32:

Xaa Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Xaa Asn Lys
 1 5 10 14

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 33:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 9 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 33:

Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg
 1 5 9

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 34:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 45 bazių poros
 (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 34:

GCCGTGAAGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCG 45

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 35:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 20 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 35:

CCNGCNCCNC CNGCNTGYGA 20

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 36:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 21 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 36:

NCCRTGNARN ACRTGRTCRT C 21

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 37:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 37:

CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA 50
TGACCACGTT CAGCACGGC 69

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 38:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 38:

GCCGTGCTGA ACGTGGTCAT CACGAGGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
CACAGGCTGG CGGCGCTGG 69

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 39:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 39:

CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50
CGACCACGTC CATCACGGC 69

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 40:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 40:

GCCGTGATGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50
CACATGCCGG AGGTGCTGG 69

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 41:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 41:

CCAGCACCGC CGGCATGTGA CCCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA 50
CGATCATGTC TATCACGGT 69

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 42:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 42:

ACCGTGATAG ACATGATCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCGGGGGT 50

CACATGCCGG CGGTGCTGG 69

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 43:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 37 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 43:

GCTAGCTCTA GAAATTGCTC CTCGTGGTCA TGCTTCT 37

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 44:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 22 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 44:

CAGTCTGCCG TGAAGGACAT. GG 22

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 45:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 24 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 45:

TGTGGACTTT AGCTTGGGAG AATG 24

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 46:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 22 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 46:

GGTCCAGGGA CCTGGAGGTT TG 22

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 47:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 31 bazių pora
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 47:

ATCGATATCG ATAGCCAGAC ACCCCGGCCA G 31

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 48:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 36 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 48:

GCTAGCTCTA GACAGGGAAG GGAGCTGTAC ATGAGA 36

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 49:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 24 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 49:

CTCCTTGGA CCCAGGGCAG GACC 24

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 50:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 24 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 50:

GGTCCTGCCC TGGGTTCCAA GGAG 24

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 51:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 27 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 51:

CTGCTCCGAG GAAAGGACTT CTGGATT 27

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 52:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 27 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 52:

AATCCAGAAG TCCTTTCCTC GGAGCAG 27

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 53:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 28 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 53:

CCCTCTGCGT CGCGGCGGCC CCACCCAC 28

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 54:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 28 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 54:

GTGGGTGGGG CCGCCGCGAC GCAGAGGG 28

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 55:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 35 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 55:

GACTCGAGGA TCCATCGATT TTTTTTTTTT TTTT 35

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 56:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 17 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 56:

GACTCGAGGA TCCATCG 17

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 57:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 32 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 57:

GCTAGCTCTA GAAGCCCGGC TCCTCCTGCC TG 32

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 58:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 21 bazių pora

(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 58:

CGAAATTAAC CCTCACTAAA G 21

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 59:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 103 bazių poros

(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 59:

TGCAGCAAGG GCTACTGCCA CACTCGAGCT GCGCAGATGC TAGCCTCAAG 50
ATGGCTGATC CAAATCGATT CCGCGGCAAA GATCTTCCGG TCCTGTAGAA 100
GCT 103

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 60:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 103 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 60:

AGCTTCTACA GGACCGGAAG ATCTTTGCCG CGGAATCGAT TTGGATCAGC 50
CATCTTGAGG CTAGCATCTG CGCAGCTCGA GTGTGGCAGT AGCCCTTGCT 100
GCA 103

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 61:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 61:

TCTCGCTACC GTTTACAG 18

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 62:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 25 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
 - (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 62:

CAGGTACCCA CCAGGCGGTC TCGGT 25

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 63:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 18 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka

- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 63:

GGGCCATGAC ACTGTCAA 18

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 64:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 40 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 64:

GACCGCCACC GAGACCGCCT GGTGGGTACC TGTGGTCCTT 40

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 65:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 32 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 65:

ATCGATATCG ATCAGCCAGA CACCCCGGCC AG 32

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 66:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 35 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 66:

TCTAGATCTA GATCACCTGA CGCAGAGGGT GGACC 35

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 67:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 33 bazių poros
 - (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 - (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 67:

AGTCGACGTC GACGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC 33

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 68:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 36 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 68:

AGTCGACGTC GACTCACCTG ACGCAGAGGG TGGACC 36

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 69:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 62 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 69:

CGCGTATGCC AGCCCGGCTC CTCCTGCTTG TGACCTCCGA GTCCTCAGTA 50

AACTGCTTCG TG 62

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 70:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 61 bazių pora
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 70:

AGTCACGAAG CAGTTTACTG AGGACTCGGA GGTCACAAGC AGGAGGAGCC 50

GGGCTGGCAT A 61

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 71:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 37 bazių poros
- (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
- (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 71:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTTC TTCTTAA 37

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 72:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 37 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 72:

CGCGTTAAGA AGAAATGCGA TATTCTTTTT CATAATT 37

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 73:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 73:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50
CACATCGAAG GTCGTAGCC 69

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 74:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 62 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 74:

TACGACCTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TGCGATATTC 50
TTTTTCATAA TT 62

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 75:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 69 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 75:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTC ATCACCATCA CCATCACCAT 50
CACATCGAAC CACGTAGCC 69

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 76:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 62 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 76:

TACGTGGTTC GATGTGATGG TGATGGTGAT GGTGATGAAA TGCGATATTC 50
TTTTTCATAA TT 62

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 77:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 19 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 77:

TCCACCCTCT GCGTCAGGT 19

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 78:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 18 bazių porų
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 78:

AGCTACCTGA CGCAGAGG 18

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 79:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 62 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 79:

GCAGCAGTTC TAGAATTATG TCNCCNGCNC CNCCNGCNTG TGACCTCCGA 50
GTTCTCAGTA AA 62

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 80:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 49 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 80:

GAAGGACATG GGAGTCACGA AGCAGTTTAC TGAGAACTCG GAGGTCACA 49

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 81:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 45 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 81:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTA TCGAAGGTCG TAGCC 45

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 82:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 38 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 82:

TACGACCTTC GATAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 83:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 45 bazių poros
(B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
(C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 83:

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT TTCTTAAACG TAGCC 45

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 84:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 38 bazių poros
 (B) TIPAS: nukleino rūgščių seka
 (C) GRADIŠKUMAS: viengrandė
 (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 84:

TACGTTTAAG AAGAAATGCG ATATTCTTTT TCATAATT 38

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 85:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 168 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 85:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Asn	Ala	Tyr	Ala	Ser	Pro	1	5	10	15
Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	20	25	30	
Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	35	40	45	
His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	50	55	60	
Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	65	70	75	
Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	80	85	90	
Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	95	100	105	
Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	110	115	120	
Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	125	130	135	
Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	140	145	150	

Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val
 155 160 165

Arg Arg Ala
 168

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 86:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 174 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 86:

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe His His His His His His His His
 1 5 10 15

Ile Glu Gly Arg Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
 20 25 30

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu
 35 40 45

Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu
 65 70 75

Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu
 80 85 90

Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu
 95 100 105

Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu
 110 115 120

Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly
 125 130 135

Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe
 140 145 150

Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly
 155 160 165

Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 170 174

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 87:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 174 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 87:

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	His	His	His	His	His	His	His	His	His	1	5	10	15
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val		20	25	30	
Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu		35	40	45	
Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu		50	55	60	
Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu		65	70	75	
Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu		80	85	90	
Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu		95	100	105	
Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu		110	115	120	
Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly		125	130	135	
Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe		140	145	150	
Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly		155	160	165	
Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala								170	174		

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 88:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 7 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 88:

Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro
1			5		7	

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 89:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 - (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 - (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 89:

His Val Leu His

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 90:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 - (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 - (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 90:

Ser Arg Leu Ser

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 91:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 - (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 - (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 91:

Ser His Val Leu

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 92:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 - (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 - (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 92:

His Ser Arg Leu

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 93:
 - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 - (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 - (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 93:

Ala Val Asp Phe

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 94:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 94:

Ser Leu Gly Glu

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 95:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 95:

Ala Val Thr Leu

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 96:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 96:

Leu Leu Glu Gly

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 97:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 97:

Leu Ser Ser Leu

1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 98:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 98:

Leu Gly Gln Leu
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 99:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 5 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 99:

Cys Xaa Leu Ser Ser
1 5

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 100:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 100:

Leu Leu Gly Gln
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 101:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 101:

Ser Ser Leu Leu
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 102:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 102:

Gly Gln Leu Ser
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 103:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 103:

Cys Leu Ser Ser
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 104:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 104:

Leu Gln Ser Leu
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 105:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 105:

Leu Gly Thr Gln
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 106:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 106:

Ala Leu Gln Ser
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 107:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 107:

Leu Leu Gly Thr
1 4

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 108:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 108:

Asn Ala Ile Phe
1 4

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 109:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 109:

Leu Ser Phe Gln
1 4

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 110:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 22 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 110:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu
1 5 10 15

Leu Arg Asp Ser His Val Leu
20 22

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 111:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 24 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 111:

His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
1 5 10 15

Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
20 24

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 112:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 23 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 112:

Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln
1 5 10 15

Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
20 23

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 113:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 21 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 113:

Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr
1 5 10 15

Cys Leu Ser Ser Leu Leu
20 21

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 114:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 16 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 114:

Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ser
16

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 115:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 22 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 115:

Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His
1				5					10					15
Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe								
				20		22								

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 116:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 25 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 116:

Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met
1				5					10					15
Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg					
				20					25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 117:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 117:

Met	Pro	Pro	Ala
1			4

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 118:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 5 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 118:

Met	Ala	Pro	Pro	Ala
1				5

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 119:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 6 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 119:

Met Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 6

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 120:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 7 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 120:

Met Ser Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 7

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 121:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 121:

Ala Pro Pro Ala
1 4

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 122:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 5 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 122:

Pro Ala Pro Pro Ala
1 5

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 123:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 6 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 123:

Ser Pro Ala Pro Pro Ala
1 5 6

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 124:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 4 amino rūgščių liekanos

(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 124:

Val Arg Arg Ala
1 4

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 125:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 5 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 125:

Val Arg Arg Ala Pro
1 5

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 126:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 6 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 126:

Val Arg Arg Ala Pro Pro
1 5 6

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 127:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 7 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 127:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
1 5 7

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 128:
(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
(A) ILGIS: 8 amino rūgščių liekanos
(B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 128:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr
1 5 8

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 129:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 9 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 129:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
 1 5 9

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 130:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 10 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 130:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val
 1 5 10

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 131:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 11 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 131:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro
 1 5 10 11

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 132:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 12 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 132:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser
 1 5 10 12

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 133:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 13 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 133:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg
1				5					10			13

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 134:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 14 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 134:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr
1				5					10				14

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 135:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 15 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 135:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 136:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 16 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 136:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

Leu
16

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 137:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 17 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 137:

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser
1				5					10					15

Leu Val
17

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 138:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 18 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 138:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15

Leu Val Leu
18

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 139:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 19 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 139:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15

Leu Val Leu Thr
19

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 140:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 20 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 140:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu
20

- (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 141:
 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 21 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė
 (xi) SEKA SEQ ID Nr.: 141:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn
 20 21

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 142:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 22 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 142:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu
 20 22

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 143:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 23 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 143:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
 20 23

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID Nr.: 144:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 (A) ILGIS: 24 amino rūgščių liekanos
 (B) TIPAS: amino rūgščių liekanų seka
 (C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKA SEQ ID Nr.: 144:

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro
 20 24

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. mpl ligando polipeptidas, gaunamas būdu, kuriame
 - (i) žmogaus genomine biblioteką tikrina su oligo-
5 nukleotidu, sudarytu pagal genomine seką,
pateiktą Fig. 9, siekiant išskirti genomine DNR,
kurioje būtų mpl ligando egzoną koduojanti seka,
pateikta Fig. 9, ir likusieji geno egzonai;
 - (ii) DNR įterpia į ekspresijos vektorių;
 - 10 (iii) žinduolių ląsteles transfekuoja šiuo vektoriumi
ir ekspresuoja geną; ir
 - (iv) mpl ligando polipeptidą išskiria iš ląstelių
kultivavimo terpės.

- 15 2. mpl ligando polipeptidas, gaunamas būdu, kuriame:
 - (i) iš genominės bibliotekos išskiria genomine DNR,
kuri hibridizuoja, esant silpno griežtumo
sąlygoms, su DNR seka
5'- GCC CTG AAG GAC GTG GTC GTC ACG AAG CAG TTT
20 ATT TAG GAG TCG -3'
ir kurios sudėtyje yra egzonai, koduojantys mpl
ligando polipeptidą;
 - (ii) DNR įterpia į ekspresijos vektorių;
 - (iii) žinduolių ląsteles transfekuoja vektoriumi ir
25 ekspresuoja geną; ir
 - (iv) mpl ligando polipeptidą išskiria iš ląstelių
kultivavimo terpės.

3. mpl ligando polipeptidas, gaunamas būdu, kuriame:
 - 30 (i) tinkamas ląsteles - žmogaus mpl ligandą koduo-
jančios RNR šaltinį - identifikuoja ir paruošia
vieną ar kelias kDNR bibliotekas iš šios RNR;
 - (ii) siekiant identifiikuoti ir išskirti kloną,
kuriame būtų mpl ligandą koduojanti seka, vykdo
35 bibliotekos ar bibliotekų atranką, hibridizacijai
naudojant žymėtą oligonukleotidą, paruoštą pagal
koduojančią seką, pateiktą Fig. 9;

- (iii) koduojančią DNR įterpia į ekspresijos vektorių, tinkamą ekspresijai žinduolių ląstelėse;
 - (iv) žinduolių ląsteles transfekuoja vektoriumi ir ekspresuoja geną; ir
 - 5 (v) mpl ligando polipeptidą išskiria iš ląstelių kultivavimo terpės.
4. mpl ligando polipeptidas, gaunamas būdu, kuriame:
- 10 (i) iš iRNR, išskirtos iš žmogaus inkstų ląstelių, paruošia kDNR biblioteką ar bibliotekas;
 - (ii) siekiant identifikuoti ir išskirti kloną, kuriame būtų mpl ligandą koduojanti seka, vykdo bibliotekos ar bibliotekų atranką, hibridizacijai naudojant žymėtą oligonukleotidą, paruoštą
 - 15 pagal koduojančią seką, pateiktą Fig. 9;
 - (iii) koduojančią DNR įterpia į ekspresijos vektorių, tinkamą ekspresijai žinduolių ląstelėse;
 - (iv) žinduolių ląsteles transfekuoja vektoriumi ir ekspresuoja geną; ir
 - 20 (v) mpl ligando polipeptidą išskiria iš ląstelių kultivavimo terpės.
5. Išskirtas, iš esmės homogeninis mpl ligandas, charakterizuojamas šiais požymiais:
- 25 (a) ligandas stimuliuoja žymėtų nukleotidų (³H-timidino) įsijungimą į Ba/F3 ląstelių, transfekuotų žmogaus mpl P ir priklausomų nuo IL-3, DNR;
 - (b) ligandas stimuliuoja ³⁵S įsijungimą į cirkuliuojančius trombocitus, naudojant atsakomosios
 - 30 trombocitozės metodą;
 - (c) ligandas yra stabilus, esant pH iki 2,5, 0,1 % SDS, ir 2 M karbamido;
 - (d) ligandas yra glikoproteinas;
 - 35 (e) polipeptido N galo amino rūgščių liekanų seka yra SPAPPACDPRLNKLRRDDHVLHGR arba SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRL.

6. mpl ligandas, gaunamas, išskiriant jį iš aplastinės plazmos hidrofobinės sąveikos chromatografija, imobilizuotų dažų chromatografija ir mpl-afinine chromatografija, turintis molekulinę masę, nustatytą SDS PAGE
5 analize redukuojančiomis sąlygomis, 18-22 kD, 28 kD arba 30 kD srityje.
7. Išskirtas mpl ligando polipeptidas, koduojamas nukleino rūgštimi, kuri hibridizuojasi, esant
10 vidutiniškai griežtom sąlygom, su nukleino rūgštimi, kurios seka prasideda 119 nukleotidu ir yra pateikta Fig. 9 (ID Nr.:4 ar ID Nr.:5)
8. Išskirtas mpl ligandas pagal bet kurią ankstesnę
15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis pasižymi biologiniu aktyvumu.
9. mpl ligando polipeptidas, kurio sekos identiškumas yra bent 70 %, lyginant su polipeptidu pagal bet kurią iš
20 1-7 punktų.
10. mpl ligando polipeptidas, kuris yra alelinis arba kitoks polipeptido pagal 1-7 punktus variantas, pasižymintis mpl ligando biologiniu aktyvumu.
25
11. mpl ligando polipeptidas pagal bet kurią iš ankstesnių punktų, besiskiriantis tuo, kad yra išskirtas iš žmogaus.
12. mpl ligando polipeptidas pagal bet kurią iš ankstesnių
30 punktų, besiskiriantis tuo, kad yra išskirtas ne iš žmogaus.
13. mpl ligando polipeptidas pagal bet kurią iš ankstesnių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra ne
35 glikozilintas.
14. Sulietas baltymas, kurio sudėtyje yra mpl ligando polipeptidas pagal bet kurią iš ankstesnių punktų ir heterologinis polipeptidas.

15. Išskirta nukleino rūgšties molekulė, koduojanti polipeptidą pagal bet kurį iš ankstesnių punktų.
16. Išskirta nukleino rūgšties molekulė, pasirenkama iš:
- 5 (a) kDNR klono, gaunamo pagal 3 punkto (iii) dalį arba pagal 4 punkto (ii) dalį;
- (b) DNR sekos, galinčios hibridizuotis, esant griežtoms sąlygoms, su klonu, gautu pagal šio punkto (a) dalį; ir
- 10 (c) bet kurio genetinio DNR sekos, gautos pagal šio punkto (a) arba pagal šio punkto (b) dalis, varianto, kuris koduoja polipeptidą, turintį gamtoje aptinkamo mpl ligando biologines savybes.
- 15 17. Išskirta nukleino rūgšties molekulė, kuri hibridizuojasi, esant vidutiniškai griežtom sąlygom, su nukleino rūgštimi, kurios seka prasideda 119 nukleotidu ir yra pateikta Fig. 9 (ID Nr.:4 ar ID Nr.:5), ir koduoja mpl ligandą.
- 20 18. Genominė DNR arba kDNR, atitinkanti bent dalį mpl ligando geno, ir kuri hibridizuojasi, esant sąlygoms nuo vidutiniškai griežtų iki labai griežtų, su gamtoje aptinkama nukleino rūgšties molekule, koduojančia mpl
- 25 ligandą pagal bet kurį iš 1-7 punktų.
19. Nukleino rūgštis pagal bet kurį iš 15-18 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra funkcionaliai sujungta su promotoriumi.
- 30 20. Ekspresijos vektorius, kurio sudėtyje yra nukleino rūgštis pagal bet kurį iš 15-18 punktų, funkcionaliai sujunta su kontroliuojančiomis sekomis, atpažįstamomis ląstelės-šeimininko.
- 35 21. Ląstelės-šeimininkai, transformuotos nukleino rūgštimi pagal bet kurį iš 15-20 punktų, sugebančios ekspresuoti nurodytas nukleino rūgšties sekas ir produkuoti mpl ligando polipeptidą.

22. Nukleino rūgšties ekspresijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad rekombinantinės nukleino rūgšties pagal bet kurį iš 15-20 punktų ekspresiją vykdo ląstelėje-šeimininke, kuri sugeba produkuoti mpl ligando polipeptidą
23. Būdas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad mpl ligando polipeptidą išskiria iš ląstelių-šeimininkų arba iš ląstelių-šeimininkų kultivavimo terpės.
24. Ekspresijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vykdo laukinio mpl ligando geno ekspresiją ląstelėje, ir ekspresija yra kontroliuojama promotoriumi/sustiprintoju, supresoriumi ar egzogeniniu transkripciją moduliuojančiu elementu, kurie buvo įterpti į ląstelės genomą tinkamu atstumu ir tinkama orientacija, kad galėtų įtakoti DNR, koduojančios mpl ligando polipeptidą, transkripciją.
25. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jos sudėtyje yra mpl ligandas pagal bet kurį iš 1-14 punktų, arba gautas būdu, pagal 22 arba 23 punktą, ir vaistų gamybai tinkamas nešiklis.
26. mpl ligando polipeptido pagal bet kurį iš 1-14 punktų, arba gauto būdu pagal 22 arba 23 punktą panaudojimas medikamentų gamybai.
27. Kompozicija pagal 25 punktą, arba gaunama pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jos sudėtyje yra terapiškai efektyvus agento, pasirinkto iš citokinų, kolonijas stimuliuojančių faktorių ir interleukinų, kiekis.
28. Kompozicija pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad agentas pasirinktas iš: LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 ir IL-11.

29. Mėginio nukleino rūgšties amplifikacijos būdas,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nukleino rūgšties
polimerazinę reakciją inicijuoja naudojant nukleino
rūgštį, atitinkančią bent dalį genominės ar kDNR pagal 18
5 punkta.

30. mpl ligando polipeptido nustatymo būdas, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad DNR pagal 18 punktą
hibridizuoja su mėginių nukleino rūgštimi ir nustato mpl
10 ligando polipeptido nukleino rūgštį.

31. mpl ligandui specifinių antikūnų gamybos būdas,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja mpl ligando
polipeptidą pagal bet kurį iš 1-14 punktų, arba gautą
15 būdu pagal 22 arba 23 punktą.

32. Būdas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad gaunami antikūnai yra monokloniniai.

20 33. Antikūnai, gaunami būdu pagal 31 arba 32 punktą.

34. Antikūnai, sugebantys jungtis su mpl ligando poli-
peptidu pagal bet kurį iš 1-14 punktų.

25 35. Antikūnai, pagal 34 punktą, b e s i s k i r i a n -
t y s tuo, kad jie yra monokloniniai.

36. Hibridominė ląstelių linija, produkuojanti antikūnus
pagal 33 punktą arba 35 punktą.

30

35


```

1  tcttctaccatctgctccccagaggggctgcctgctgtgcaacttgggtcctggagcccttctccaccgggatagattcctcacccttggccccgccttgg

101  ccccaacctactctgccagaagtgaagagcctaagcgcctccatggccccaggaagattcaggggagagggcccccaaacagggagccacgcccagcca

201  gacaccccgccagaATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGGTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTG
    -20      ▼      -10      ▼
    MetGluLeuThrGluLeuLeuLeuValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCysAsp
    10      20      30      40
    LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeu
301  ACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCCTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGCCCCAGAGGTTACACCTTTGCCTACACCTGTCTGCT
    50      60      70
    ProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGlyVal
401  GCCTGCTGTGACTTTAGCTTGGAGAAATGGAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATCTCTGGGAGCAGTGACCCCTTCTGCTGGAGGGAGTG
    80      90      100
    MetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu
501  ATGGCAGCACGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCATCCCTCCTGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCC
    110      120      130      140
    GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPhe
601  TTGGAACCCAGCTTCCCTCCACAGGGCAGGACACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCTTCTGAGCTTCCCAACACCTTGCTCCGAGGAAAGGTGCGT
    150      160      170
    LeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeuThrLeuAsnGluLeu
701  CCTGATGCTTGTAGGAGGTCCACCCCTCTGCGTCAGCGGGCCCCACCCACACAGCTGTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCTCACACTGAACGAGCTC
    180      190      200
    ProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLysIle
801  CCAAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGGATTTCAGAGCCCAAGA

```

FIG. 1A

```

210      ProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPhePro
220      230      240
901  TTCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTCTTGAATGGAACTCGTGGACTCTTTCC

      250      260      270
      GlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnProGlyTyrSerProSer
1001  TGGACCTTCACGCAGGACCCTAGGAGCCCCGGACATTTCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAACCTCCAGCCTGGATATTCTCCTTCC

      280      290      300
      ProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSerAla
1101  CCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCACCCACCTTGCCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTTGCTTCTGACCCCTTCTG

      310      320      330
      ProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly
1201  CTCCAACGCCACCCCTACCAAGCCCTCTTCTAACACACATCCTACACCCACTCCAGAAATCTGTCTCAGGAAGGTAAGTtctcagacactgccgacatc

1301  agcattgtctcatgtacagctcccttccctgcaggggccctgggagacaaactggacaagatttctctactttctcctgaaaccccaagccctggtaaaa

1401  gggatacacaggactgaaaagggaatcatttttctactgtacattataaaccttcagaagctattttttaagctatcagcaatactcatcagagcagcta

1501  gctctttggctctattttctgcagaaaatttgcaactcaactgatttctctacatgctcttttctgtgataaactctgcaaggcctgggctggcaggtt

1601  gaacagagggagagactaaccttgagtcagaaaaacagagaaagggttaatttctcttggcttcaaatccaagccctccaacgcccccatcccccttactat

1701  cattctcagtgaggactctgatcccatattcttaacagatctttactcttgagaaatgaataagctttctctcagaaaaaaataaaaaaa

```

FIG. 1B

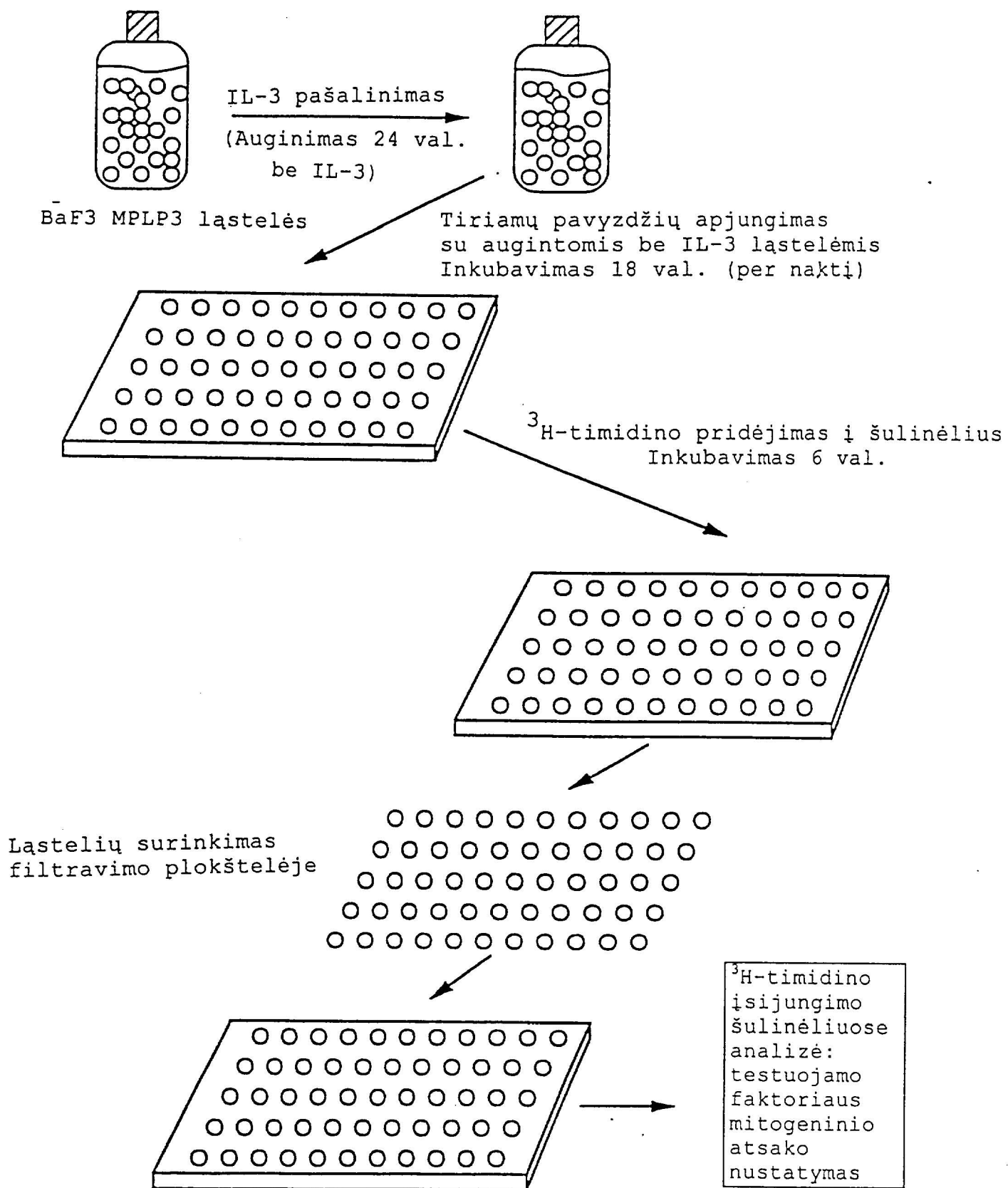


FIG.2

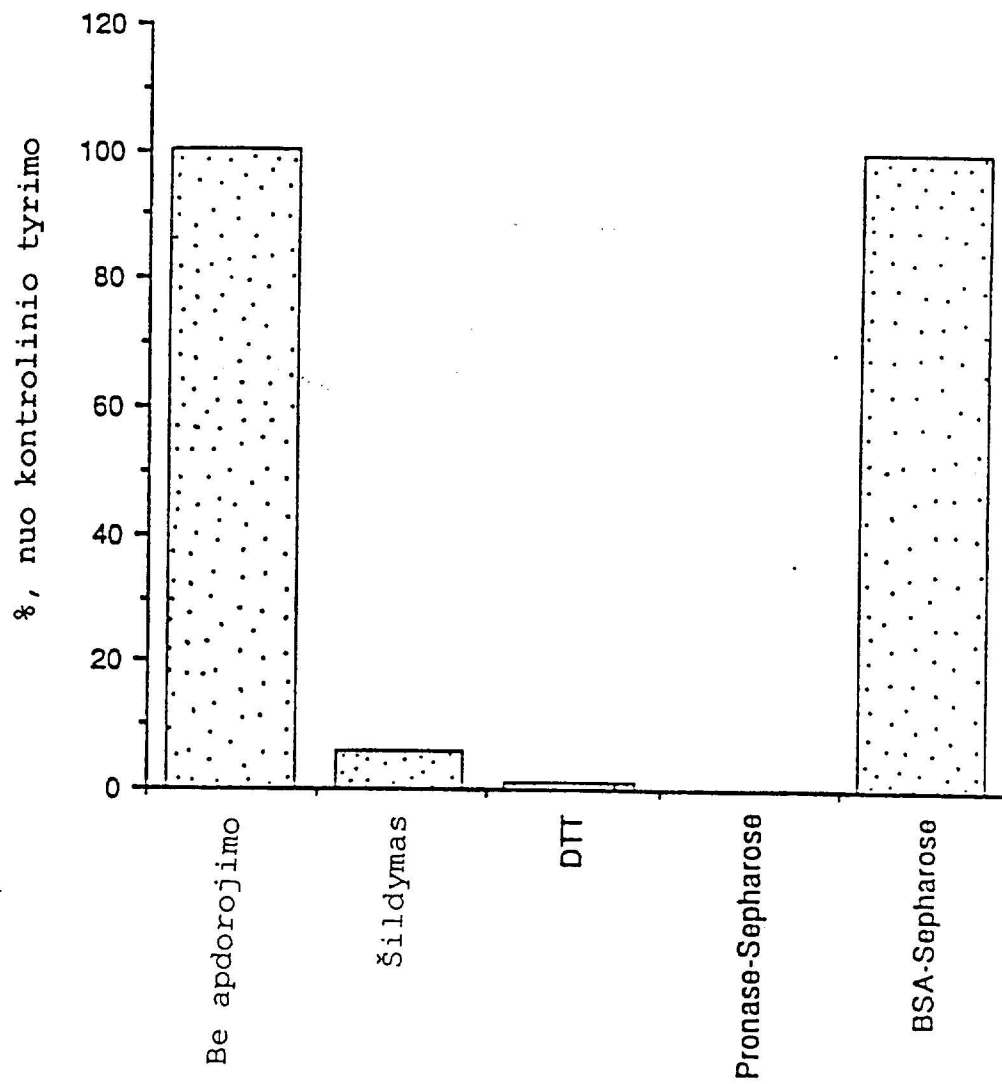


FIG.3

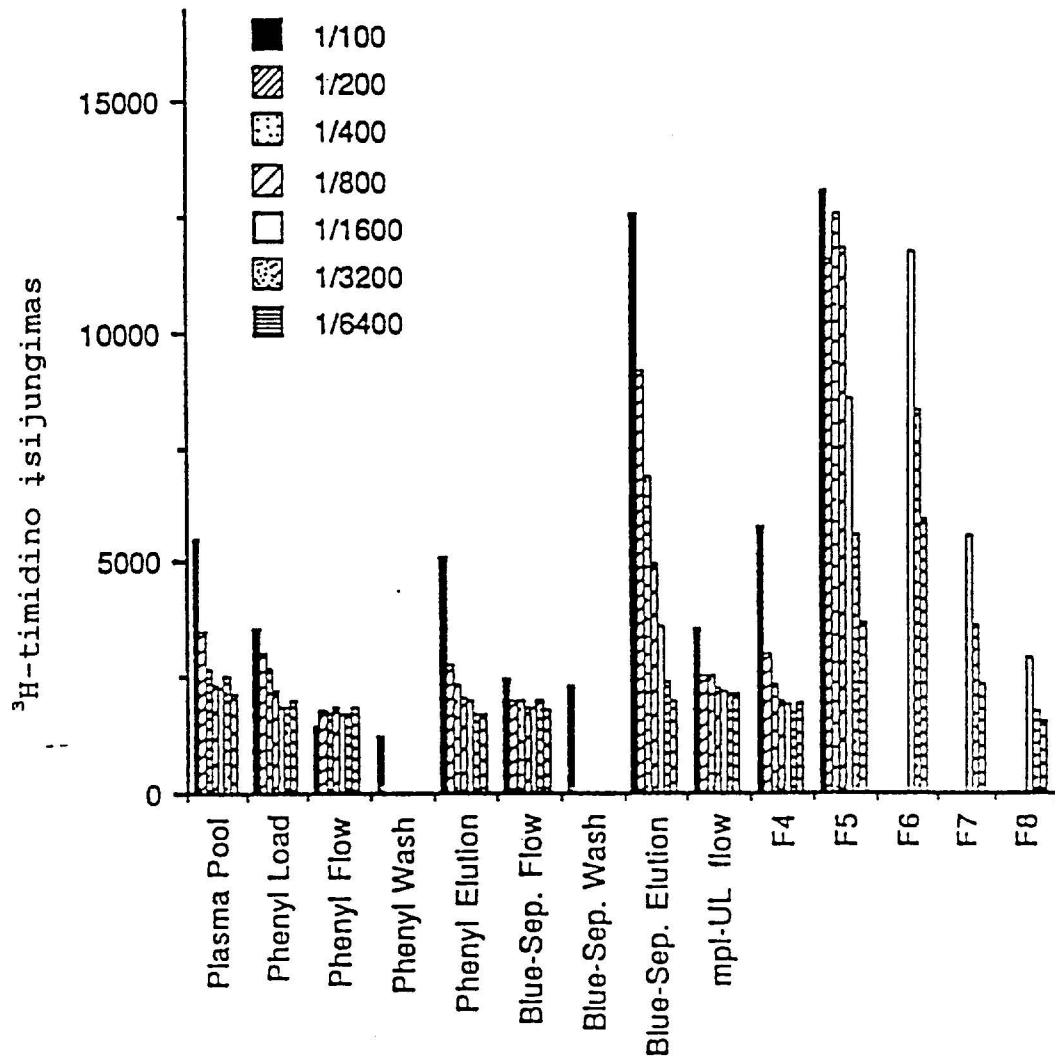


FIG.4

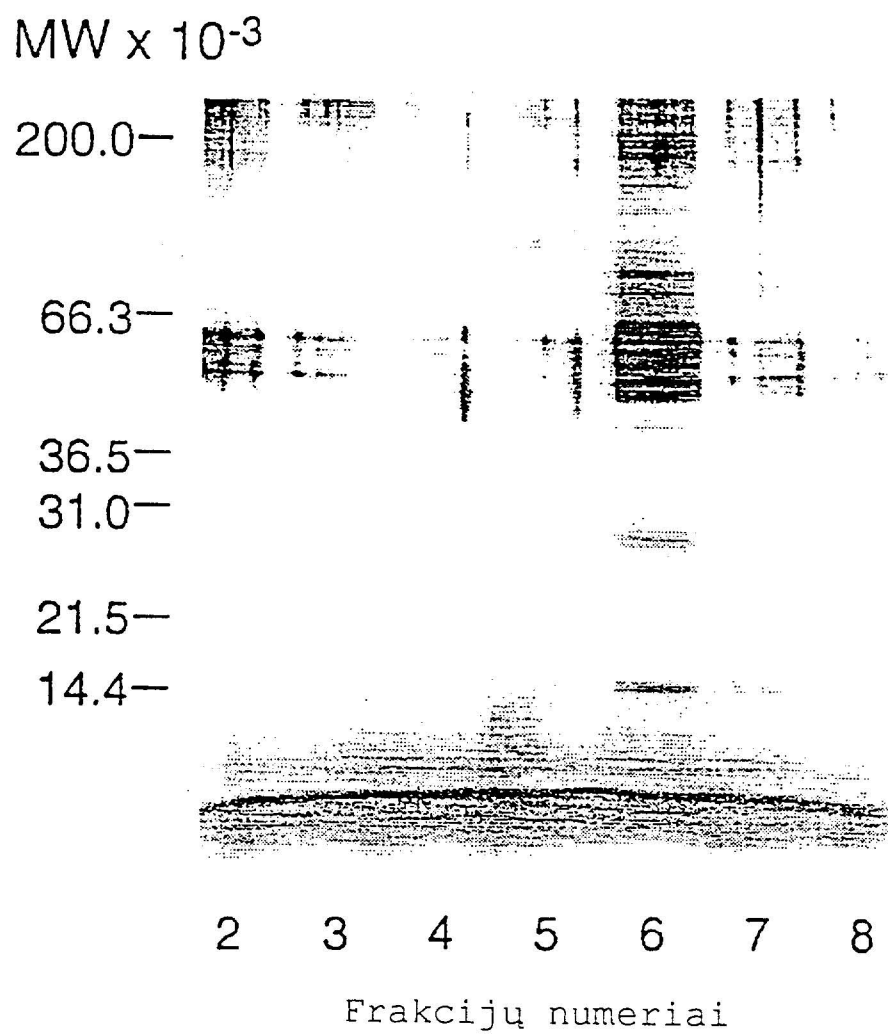


FIG. 5

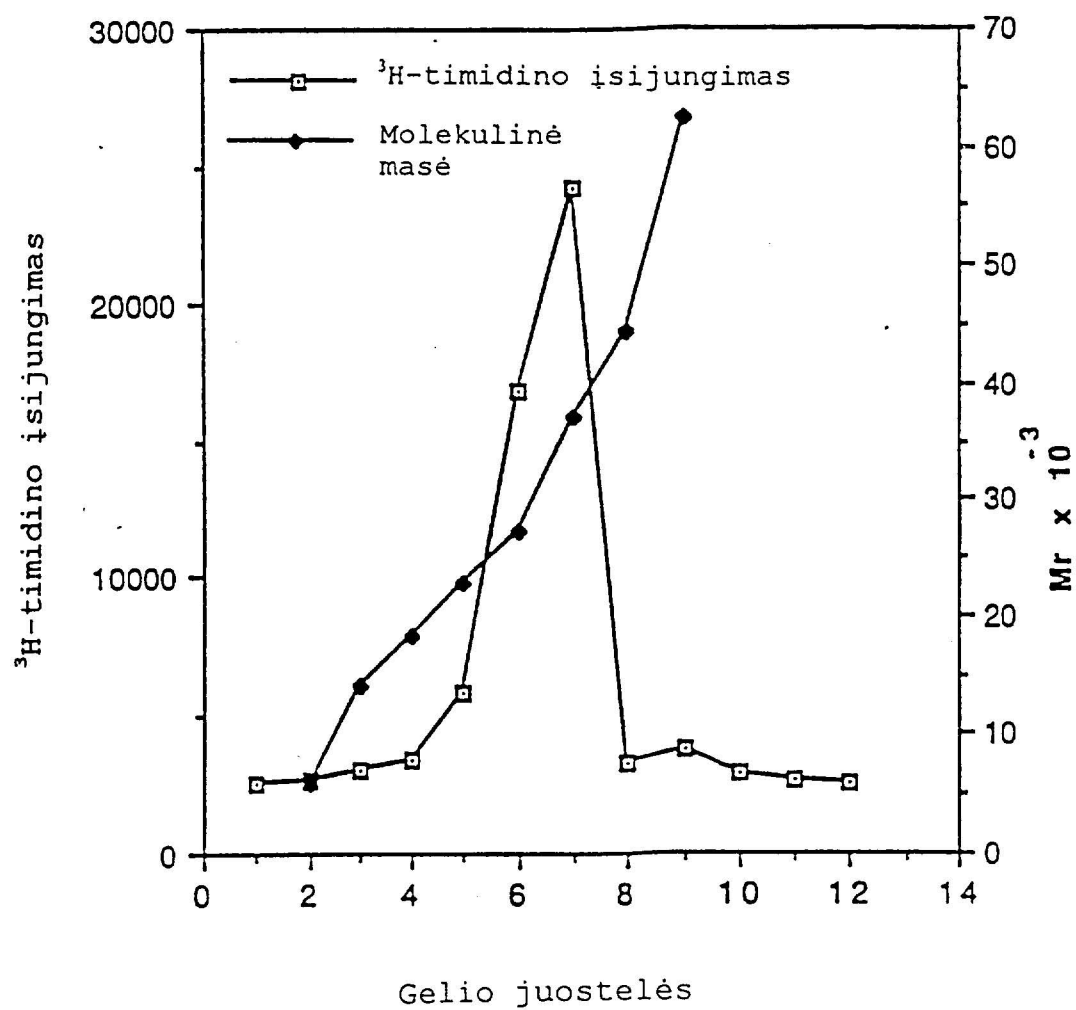


FIG.6

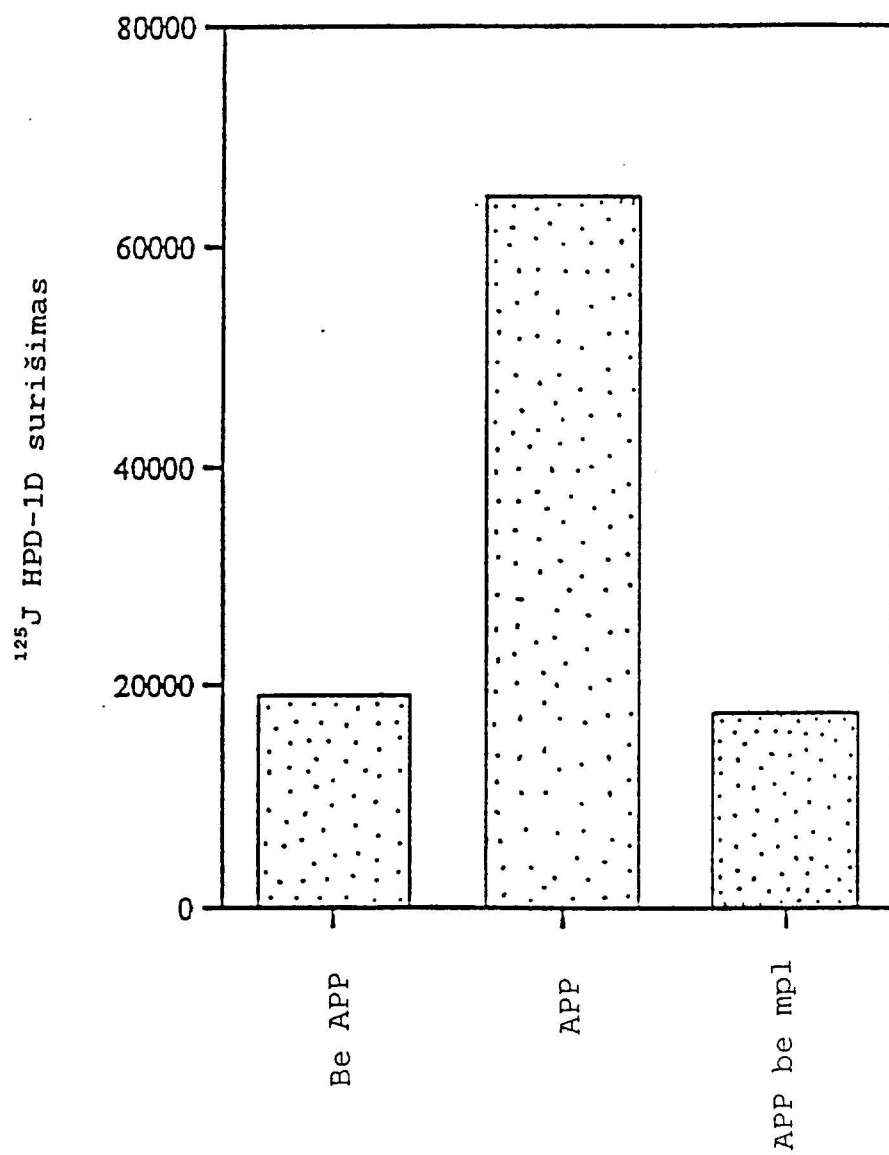


FIG.7

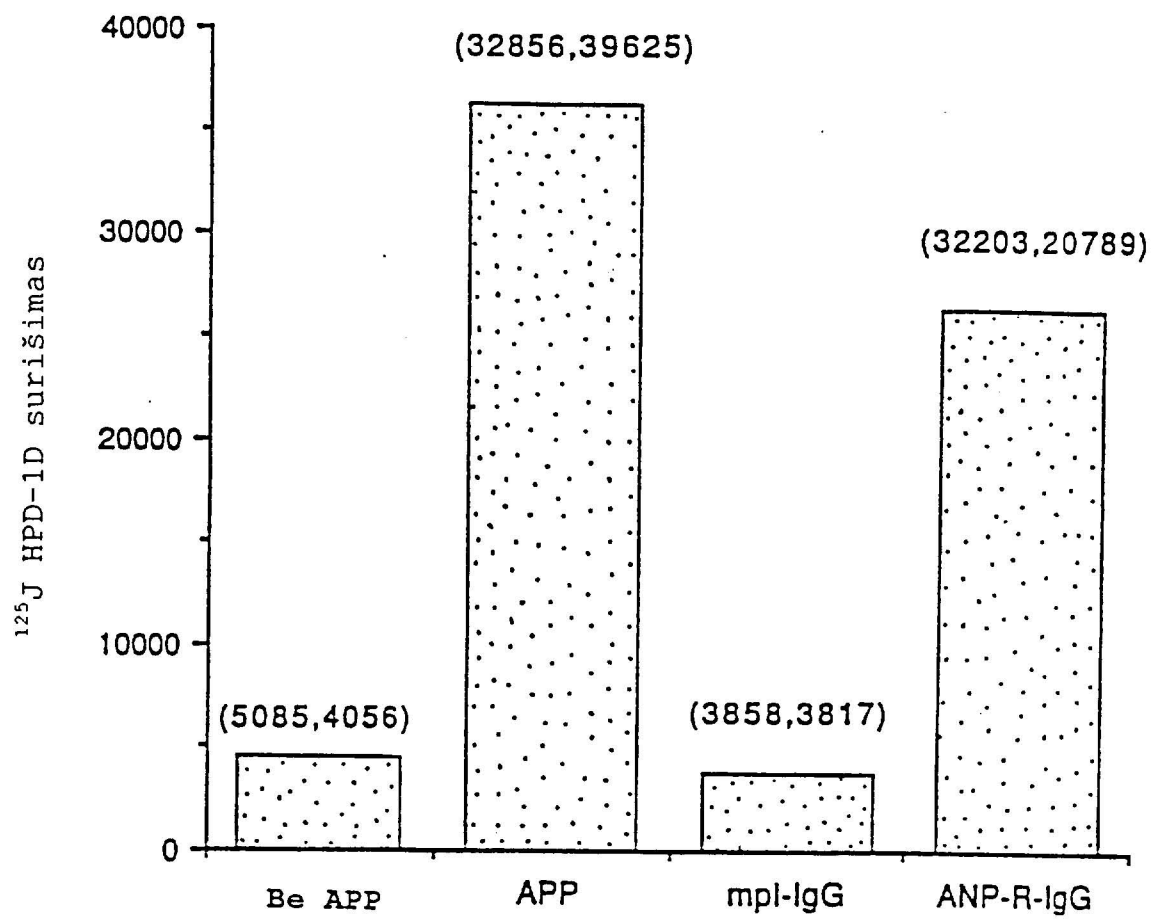


FIG.8

```

1 GAATTCTCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT CACCTCTCCT CATCTAAGAA TGGTCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT
CTTAAGGACC TTATGGTCCA CTGTTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA
      L L L V V M L L L T
      ↓
      -10

A R L T L S S P A P A P A C D L R V L S K L L R D S H V L H S R L ↓
101 GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTG TG ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA
CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA GGAGTCATTT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTG TCTGACCACT
      10      20

201 GAACTCCCAA CATTATCCCC TTTATCCGG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCCAGGAA GACACCATCA CTTCTCTTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT
CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AATAGGCGC ATTGACCATT CTGTGGGTAT GAGGGTCCTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAAGTGG GTTACTGATA

301 TCTTCCCATTA TTGTCCCCAC CTA CTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAAT ACAGCCCGCA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA
AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA AGAAGTGTTA TGTCGGGCGT AAATTTTCGA GAGCAGATCT

```

FIG.9

h-ML 1 SPAPPACD LRVLSKLLRD SHV LHSRLSQCP E VHP L PTPVLLP AVDFS LGE
 h-epo 1 APPRLICD SRVLE ERYL LEAK E AEN ITTGCAE HCS L NENITVP DTKVNFYA

h-ML 51 WK TQMEETK A Q D I L G A V T L L E G V M A A R G Q L G P T C L S - - S L L G Q L S G Q V R
 h-epo 51 WK RMEVGOQA V E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S

h-ML 99 LL - - L G A L Q S L L G T Q - - - L P P Q G R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R G K V R F L -
 h-epo 101 GL R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I T A D T F R K L F R V Y S N F L R

h-ML 143 - - M L V G G S T L C V R R A P P T T A V P S R T S L V L T L N E L P N R T S G L L E T N F T A S A
 h-epo 151 G K L K L Y T G E A C R T G D R

h-ML 191 R T T G S G L L K W Q Q G F R A K I P G L L N Q T S R S L D Q I P G Y L N R I H E L L N G T R G L F

h-ML 241 P G P S R R T L G A P D I S S G T S D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P

h-ML 291 I L P T P V V Q L H P L L P D P S A P T P T S P L L N T S Y T H S Q N L S Q E G

FIG.10

hML	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML2	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML3	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML4	1	SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDFSLGE
hML	51	WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML2	51	WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML3	51	WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML4	51	WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLL
hML	101	LGALQSL LGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
hML2	101	LGALQSL LGT. . . QGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL
hML3	101	LGALQSL LGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK. DF. W. IVGDKLH
hML4	101	LGALQSL LGT. . . QGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGK. DF. W. IVGDKLH
hML	151	CVRRAPPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW
hML2	147	CVRRAPPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW
hML3	149	CLSQ. NYWL. WAS. EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ. .
hML4	145	CLSQ. NYWL. WAS. EVAAGIQSQDSWSAEPNLQ. .

FIG. 11A

FIG. 11B

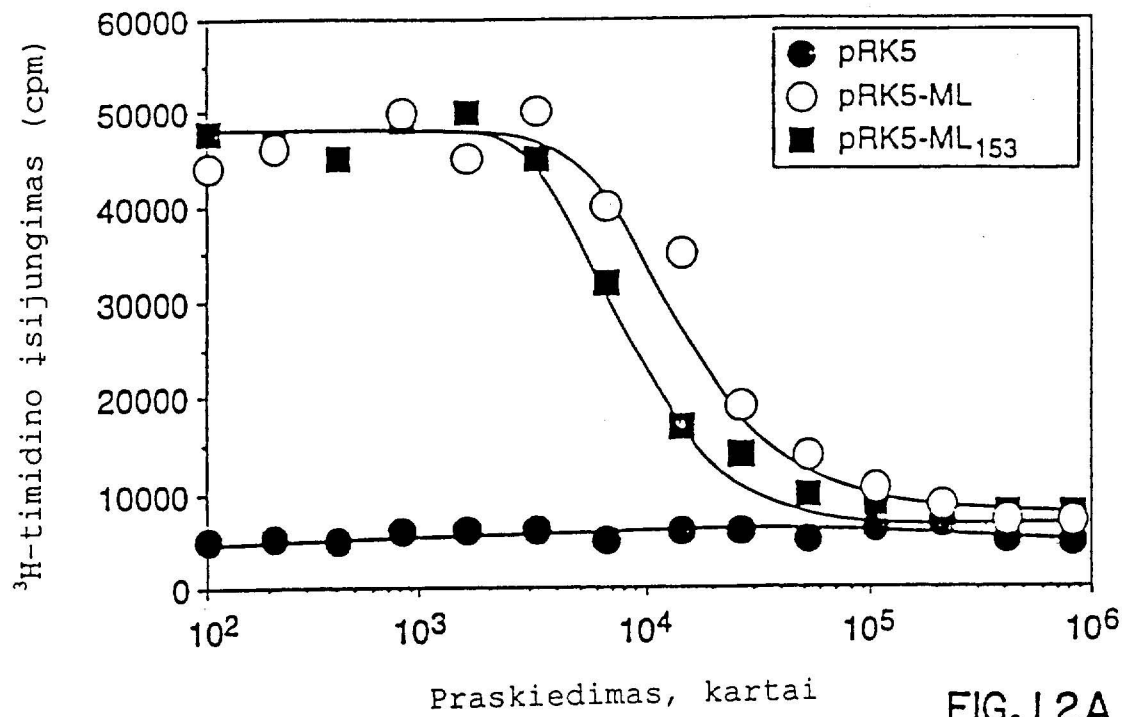


FIG. 12A

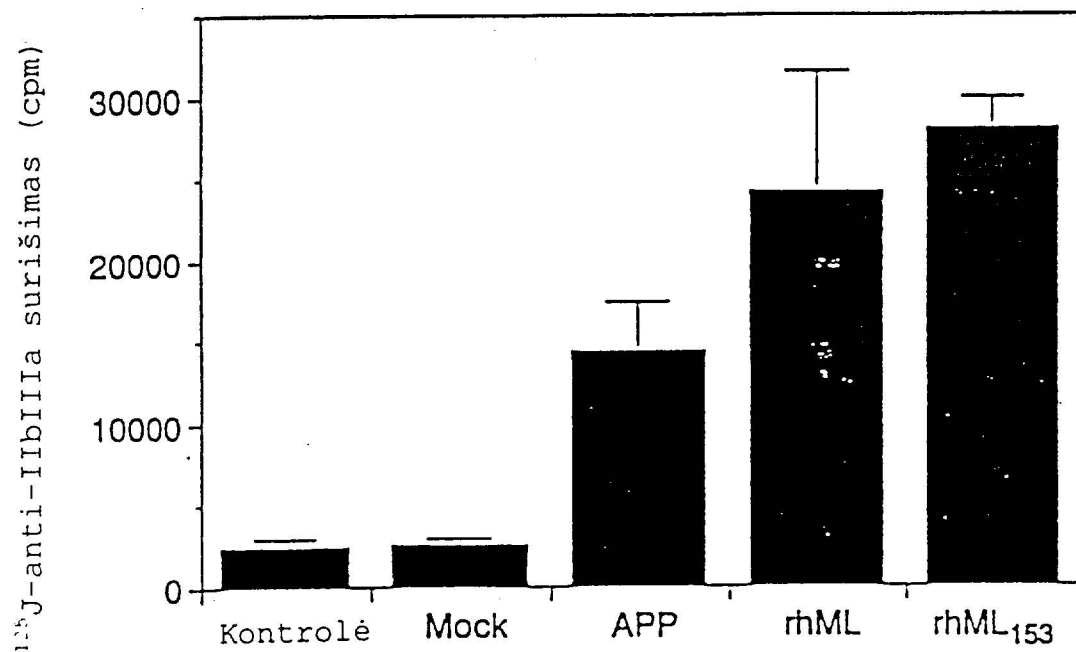


FIG. 12B

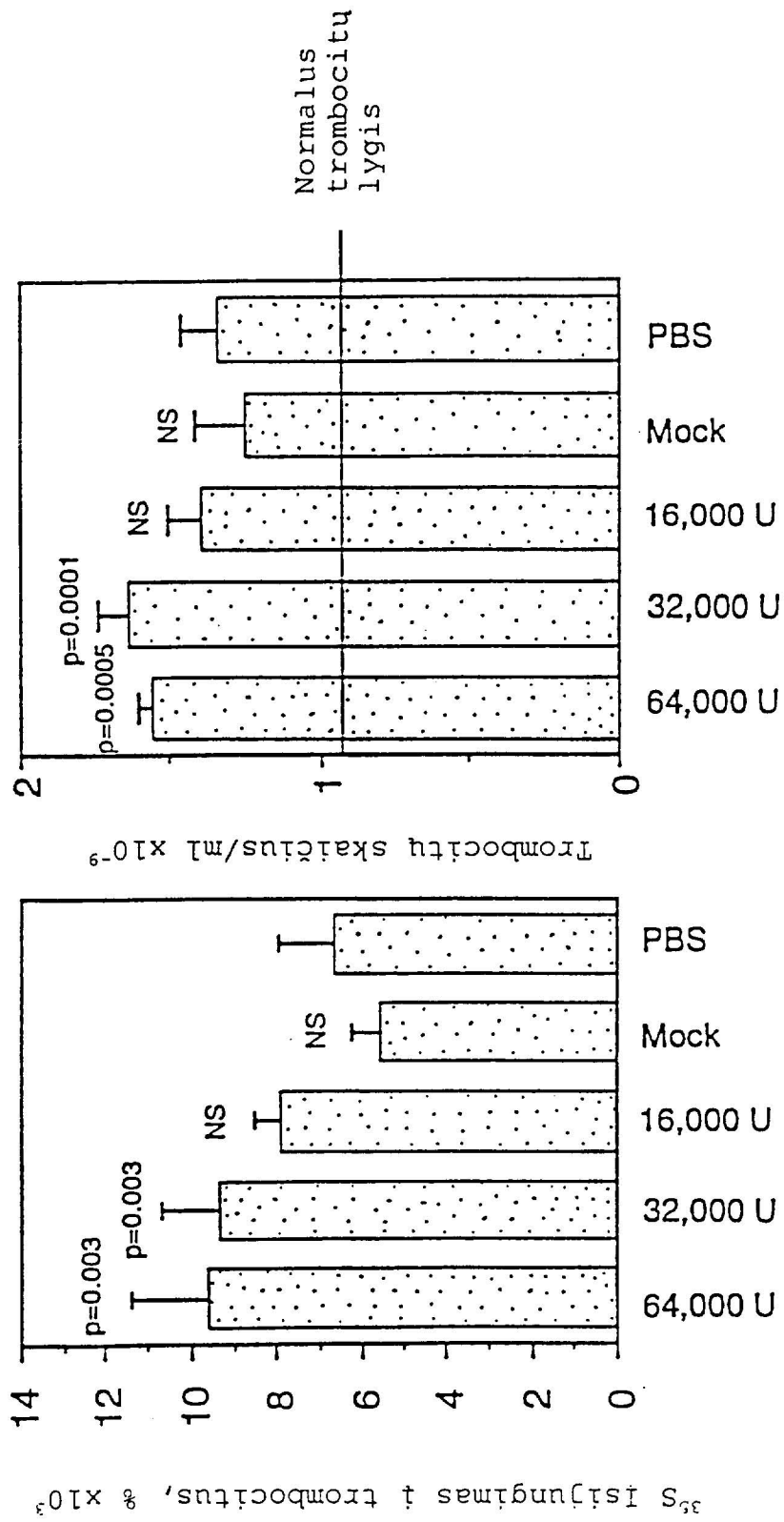


FIG. 12C

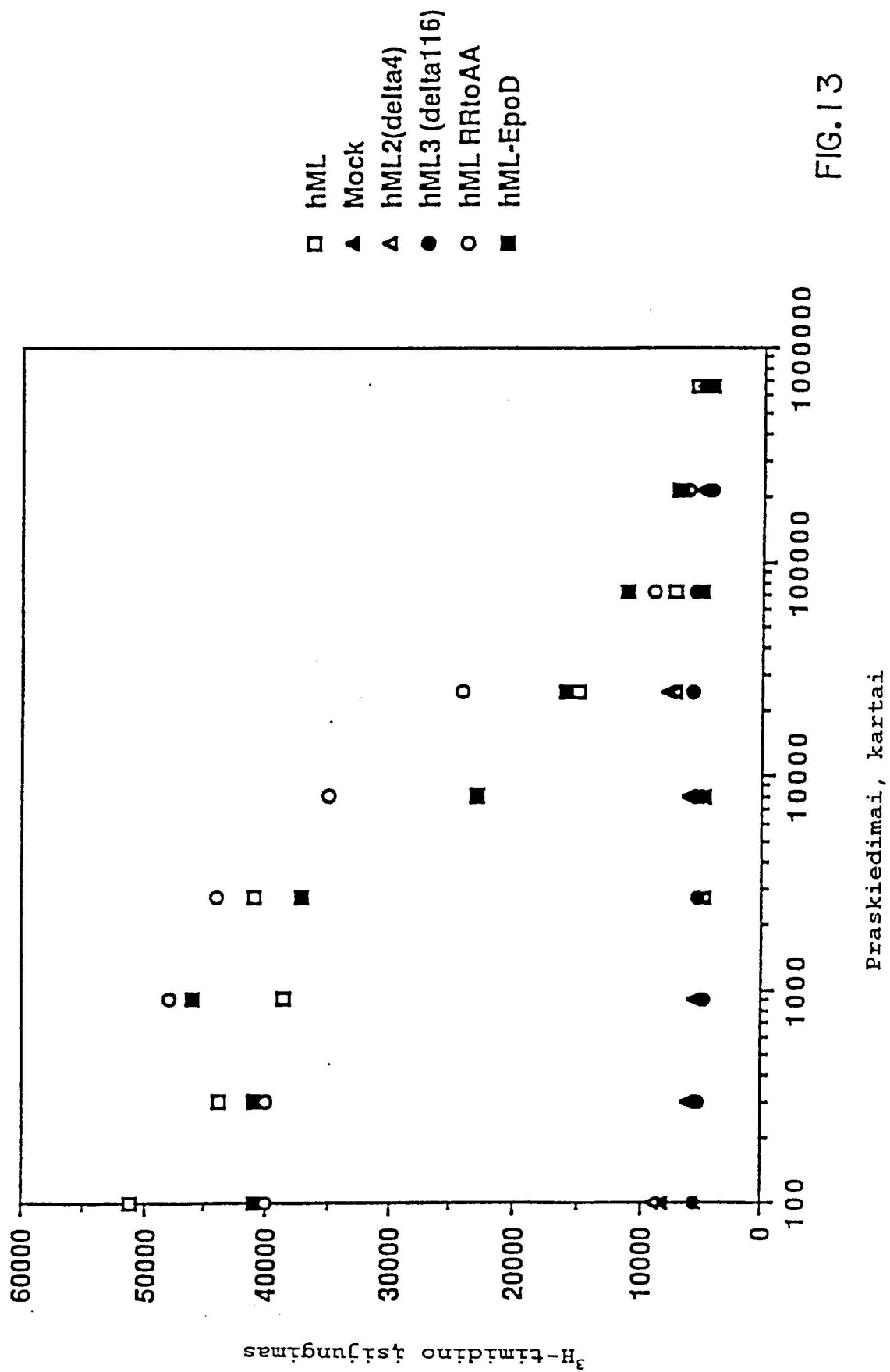


FIG. 13


```

1  ccagcctccttctctgttccctgggtcatgcctgcctcctgtctcctgtctcctccacacacacccactatcctcccagctatccctacacc
101  tccttcctaacttgggagacatctcgtctggctggacgggaaaattccaggatctaggccacacttctcagcagacatgcccatccttggggaggagga
201  acaggagagagcctgagggaagtctctgggggacagggggatgatgggatcaagggtcaggccaggaaagccctgaggacagagactgtggggagactgggac
301  tgggaagaaaaggagctagagccagggcccaaaaggggggccagcagggtatttgggggggaggtccaggcagctgtcttccctaagaca
401  gggacacatggggcctggttattcctcttgtcacatgtggaacggtaggagatggaagacggagacagaacaaggaaggggccctgggcacagagggtc
501  tgtgtgtgtagccatccaagccactggacccagcagcagacctaagctcaggcttaaccagtgcacgtgtgcgcacatacatgtgccccgcacct
601  gacagtccactcaaccgtccaacccttccccatacaccaaccataaacaggagatttctctcatgtgggcaatatccgtgttcccacttcgaaaagg
701  gggaaatgacaagataggactccctaggggtattacagaaagaaagcaggaaagcagcatcctgttggtatttcagcagcaggtatgatgtccagggaaaa
801  gaaatttgatagccagggtgaaaacccccaccaaactctaaacaagacctctgtgcttcttccccagcaacacaaaatgtcctgccagattcctcctcctgga
901  aaaaaacttctgctcctgtccccctccagggtcccagggttgccccatgtccaggaaaaagatggatccccctatccaaaatcttctccgtgggtgtgtgggtg
1001  gaggagtggaccctgggtccaggcggggtccaggggagagaaaggcgtcacttccgggggccttcaccagtgctgtgggtggctcccttctctgtattgggca
    < kDNR sekos pradžia; Egzonas 1 >
1101  gaagtggcccaggcagcgctatgacctgctgctgtggagggtgtgtgcccaccgccacatgtctTCCTACCCCATCTGCTCCCCAGAGGGCTGCCTGCTG
1201  TGCACCTGGGTCTGGAGCCCTTCTCCACCCGGtgagtggccagcagggtgtggggttatgtgagggtagaaaaggacagcaaaagagaaaatgggctccccag
1301  ctgggggaggggcaggcaaaactggaacctacaggcactgacctttgtcagagaagagtgtagccttcccagaaatgggaggagcagggcagagcagggtag
1401  ggggtggggtgctggttctgagggactgattcacttacttgggtggaatacacagcacagccccctggctggccctaaagggaaggggacatgagccccaggagaaa
1501  aataagagagggagctgcacttagggcttagcaaacacagtagtaagatggacacagcccccaatccccattcttagctgggtcatctcctcgttagctttaag
1601  gttctgaatctgggtgctggggaagctggggccaggcaggcgaaggagaggggtaaatgggaggggggccactcatgtttgacagacctacaggaaaa

```

FIG. 14A

9 ValValMetLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProAlaProAlaCysAspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisVal
3301 GTGGTCATGCTTCTCCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGCTCCTCCTGCTGTGACCTCCGAGTCCCTCAGTAACTGCTTCGTGACTCCCATG

Signalinio peptido galas^

43 LeuHisSerArgLeu

3401 TCCTTCACAGCAGACTGGtgagaactcccaacattatccccctttatccgcgtaactggtaagacacccatactcccaggaagacacccatcacttcctcta
3501 actccttgacccaatgactattcttcccatattgtccccacctactgatcacactctctgacaagaattattcttcacaatacagccccgcattttaaaagc
3601 tctcgtctagagatagtagtgaggactagcctgcttattaggctaccatagctctctctatttcagctcccccttctccccccaccaaactcttttttcaa
<Egzonas 4>

48 SerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMet

3701 cagAGCCAGTGCCACAGAGGTTACCCCTTTGCCCTACACCTGTCTGCTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAAACCCAGATGGtaagaaagc
3801 catccctaacccttggttccctaagtccctgtcttcagtttccccactgcttccccatggattctccaacattcttggagcttttttaaaaaatatctcaccttca
3901 gcttggccaccctaaccatctacattcacctatgatgatagcctgtggataagatgatggcttgcaggtcccaatatgtgaatagatttgaagctgaac
4001 accatgaaaaagctggagagaaaaatcgctcatggccatgacctttgacctatttccygttccagttctttaaattggcatgaagaagcaagactcatatgtcat
4101 ccacagatgacacaaaagctgggaagtaccactaaaaataacaaaagactgaatcaagattcaaatcactgaaagactagggtcaaaaaacaagggtgaaacaac
4201 agagatataaaacttctacatgtgggcccgggggctcacgcctgttaatccccagcactttggggagccgagggcagagatcacctgagggcaggagtgttgag
4301 agcagcctggcccaacatggcgaaaccccgtctctactaagaatacaaaaattagccgggcatggtagtgcatgcctgtaatcccagctacttggaaaggctg
4401 aagcaggagaatcccttgaacccaggagggtggagggttgtagtgagctgagatcatgccaatgcactccagcctgggtgacaagagcaaaaactccgtctca
4501 aaaagaaaaaaaattctacatgtgtataattaatgagtaaaagtccatttccagcttttcagggccacaatgccccctgcttcccatcattttaagcctcttggcccc
4601 agcacttcctacgaaaaaggatctgagagaaattaaattgcccccaaaacttaccatgtaaacattactgaagctgctatttcttaaaagctagtaattcttctgtct
4701 gtttgatgttttagcatccccatttgtgaaatgctcgtaacagaactctatttccgagtggaactaacacttaaatatactggcctgaacacccggacatccccct
4801 gaagacatatgtctaatttattaagaggggaccatatataaaactaacatgtgtctagaaaaagcagcagcctgaacagaaaagagactagaagcatgtttttatggg

FIG. 14C

```

4901 caatagttttaaaaaactaaatctatcctcaagaaccctagcgtcccttctccttcaggactgagtcagggaaagaaggcagttcctatgggtcccttc
5001 tagtcctttcttttcateccttatgatcattatggtagagtctcatacctacatttagtttattattattattattttgagacggagtgctcactctatccc
5101 ccaggctggagtgagtgcatctcaactcactgcaaacctcagcctcccgattcaagcgattctcctgcctcagtcctcccaagtagctgggattac
5201 aggtgccccaccaccatgccccagctaatttttgtagatgggtttccaccatgttgccaggctgatcttgaactcctgacctcaggtgat
5301 ccacctgcctcagcctcccaaagtctgggtattacaggcgtgagccactgcacccagccttcatcagtttaaaaaatcaaatgatcctaaaggtttttgcag
5401 cagaaaagagtaaatbtgcagcactagaaccaagaggtaaaagctgtaacagggcagatttcagcaacgtaagaaaaaaggagctcttctcactgaaaacca
5501 agtgaagaccaggctggactagaggacacgggagtttttgaagcagaggctgatgaccagctgtcgggagactgtgaaggaattcctgcccctgggtggg
5601 accttggtcctgtccagttctcagcctgtatgattcactctgtgtggtactcctcaaggctccccaccgcttttagtggtgcccctttgaggcagtgcgctt
77  <Egzonas 5>
77  GluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeu
5701 ctctcttccatctcttctcagGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGAGCAGTGACCCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGGACAACTG
103 GlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeuGlyThrGln
5801 GGACCCACTTGCCCTCTCATCCCTCCTGGGCGAGCTTCTGGACAGGTCCGCTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCCTCCTTGGAACCCAGgtaagtcccc
5901 agtcaagggatctgtagaaactgttcttctgactcagtcctcactagaagacctgaggggaagaaggctcttccaggaggctcaagggcagaagagctg
6001 atctactaagagtgtccctgccagccacaatgcctgggtactggcatcctgtcttcttctacttagacaaggaggcctgagatctgcccctgggtgtttg
133  <Egzonas 6>
6101 LeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArg
GCCTCAGGACCATCCTCTGCCCTCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACACAGCTCACAAAGGATCCCAATGCCATCTTCTCTGAGTTTCCAACACACCTGCTCCG
=====^ Alternatyvi splaisingo vieta ^C kDNR klonui
158 GlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeu
6201 AGCAAAGGTGCGTTTCTCTGATGCTTGTAGGAGGCTCCACCCTCTGGCTCAGGGGGCCCCACCCACCCACAGCTGTCCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCCCTC
191 ThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGly
6301 ACACCTGAACGAGCTCCCAACACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGG

```

FIG. 14D

225 PheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThr
 6401 GATTTCAGAGCCCAAGATTCCCTGGTCTGTGTAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAATCCCCGGATACCTGAAACAGGATACACGAACTCTTGAATGGAAC

 258 ArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnPro
 6501 TCGTGGACTCTTTCCCTGGACCCCTACGCAGGACCCCTAGGAGCCCCGGACATTTCCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAAACCTCCAGCCT

 291 GlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrProValGlnLeuHisProLeuLeu
 6601 GGATAATTCTCCTTCCCCAACCCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGTC

 325 ProAspProSerAlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly: STOP
 6701 TTCCTGACCCCTTCTGCTCCACGCCCCACCCCTACGACCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAAGATCTGTCTCAGGAAGGTAAGGTCTCTCA

 6801 GACACTGCCGACATCAGCATTTGTCTCATGTACAGCTCCCTTCCCTGCAGGGGCCCTGGGAGACAACTGGACAAAGATTTCTCTCTGAAACCCC

 6901 AAAGCCCTGGTAAAGGGATACACAGGACTGAAAGGGAATCATTTTTCACCTGTACATATATAAACCTTCAGAAAGCTATTTTTTAAGCTATCAGCAATAC

 7001 TCATCAGAGCAGCTAGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCAGAAATTTGCAACTCACTGATTCTCTACATGCTCTTTTCTGTGATAACTCTGCAAAAGGCCTGG

 7101 GCTGGCCTGGCAGTTGAACAGAGGGAGAGACTAACCTTGAGTCAGAAACACAGAGAAAGGTAATTTCCCTTTGCTTCAAATTCAAAGGCCCTTCCAACGCCCC

 7201 CATCCCCCTTACTATCATTTCTCAGTGGGACTCTGATCCCCATATTCTTAACAGATCTTTACTCTTGAGAAATGAATAAGCTTTCTCTCAGAAATgctgtcc
 ^PolIA vieta

 7301 ctatacactagacaaaaactgagcctgtataaggaaataaaatgggagcgccgaaaaagctccctaaaaagcaagggaagatgttcttcgaggggtggcaatag

 7401 atccccctcaccctgccacccccaaaaaagtaaacaggaaagccttggagagccctcacacccccaggtaaggctgtgtagacagttcagtaaaagacagg

 7501 acctggatgtgacagctgagcaaacagctagagcttbtggcagctcagcaggaggcttbtggccaggcatggacgcctgcctccctgtggagggtcaggag

 7601 gaagtgcaggaaagtggcatgagtcaggctccttbgactcacacagcaggagaacaagtacaaagtcaaggttgaaaggtcatttccccagttccccgc

 7701 aaatgcatctaaaaagcagctctgtgtgaccaccataaaactctgctaggggatctcttaaaaaaggagtcaggcttatggggcttbtgcaaaataagtgctgcc

 7801 ttgggtgctcaggaaaaagggttbtgtgttgcaaaaaaacacaaattccactgc

FIG.14E

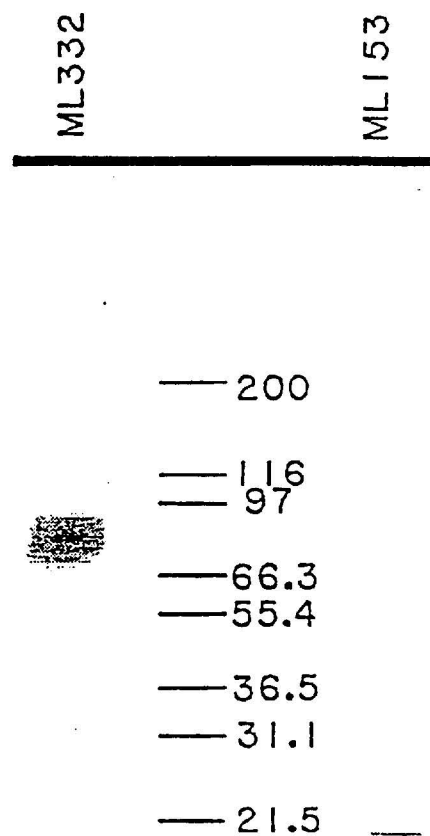


FIG. 15

```

1 GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG AAGCTCAAGC GCCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAAGG GAGAGGCCCC
      -20
101 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCCT GGCACAGAAATG GAGCTGACTG AATTGCTCCT GGCGGCCATG CTTCTTGCA TGGCAAGACT AACTCTGTCC
      -10
      Met GluLeuThrA spLeuLeuLe uAlaAlaMet LeuLeuAlaV alAlaArgLe uThrLeuSer
      20
      30
      SerProValA laProAlaCy sAspProArg LeuLeuAsnL ysLeuLeuAr gAspSerHis LeuLeuHisS erArgLeuSe rGlnCysPro AspValAspPro
201 AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCCGA CTCCTAATA AACTGCTGCG TGACTCCAC CTCCTTCACA GCCGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTCGACC
      40
      50
      60
      LeuSerIl eProValLeu LeuProAlaV alAspPheSe rLeuGlyGlu TrpLysThrG lnThrGluGl nSerLysAla GlnAspIleL euGlyAlaVal
301 CTTTGTCTAT CCTGTCTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCGTGGAGAA TGGNAACCC AGACGGAAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT
      70
      80
      90
      SerLeuLeu LeuGluGlyV alMetAlaAl alArgGlyGln LeuGluProS erCysLeuSe rSerLeuLeu GlyGlnLeuS erGlyGlnVa lArgLeuLeu
401 GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAAACCCT CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC
      100
      110
      120
      130
      LeuGlyAlaL euGlnGlyLe uLeuGlyThr GlnGlyArgT hrThrAlaHi sLysAspPro AsnAlaLeuP heLeuSerLe uGlnGlnLeu LeuArgGlyLys
501 TTGGGGGCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CCTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGACCCC AATGCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAACATG CTTCGGGGAA
      140
      150
      160
      ValArgPh eLeuLeuLeu ValGluGlyP roThrLeuCy sValArgArg ThrLeuProT hrThrAlaVa lProSerSer ThrSerGlnL euLeuThrLeu
601 AGGTGGCCTT CCTGCTTCTG GTAGAAGGTC CCACCTCTG TGTCAGACGG ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT

```

FIG. 16A

```

170
  AsnLysPhe ProAsnArgT hrSerGlyLe uLeuGluThr AsnPheSerV alThrAlaAr gThrAlaGly ProGlyLeuL euSerArgLe uGlnGlyPhe
701 AAACAAGTTC CCAACACAGGA CTTCTGGATT GTTGAGAGACG AACTTCAGTG TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTC

  ArgValLysI leThrProG1 yGlnLeuAsn GlnThrSerA rgSerProVa lGlnIleSer GlyTyrLeuA snArgThrHi sGlyProVal AsnGlyThrHis
801 AGAGTCAAGA TTAATCTCTGG TCAGCTAAAT CAAACCTCCA GGTCCCCAGT CCAATCTCT GGATACCTGA ACAGGACACA CGGACCTGTG AATGGAACTC

  GlyLeuph eAlaGlyThr SerLeuGlnT hrLeuGluAl aSerAspIle SerProGlyA laPheAsnLy sGlySerLeu AlaPheAsnL euGlnGlyGly
901 ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACTTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC TCGCCCGGAG CTTTCAACAA AGGCTCCCTG GCATTCACACC TCCAGGGTGG

  LeuProPro SerProSerL euAlaProAs pGlyHisThr PropheProp roSerProAl aLeuProThr ThrHisGlyS erProProG1 nLeuHisPro
1001 ACTTCCTCCT TCTCCAAGCC TTGCTCCTGA TGGACACACA CCCTTCCCTC CTTACACCTGC CTTGCCACC ACCCATGGAT CTCCACCCCCA GCTCCACCCCC

  LeuPheProA spProSerTh rThrMetPro AsnSerThrA laProHisPr oValThrMet TyrProHisP roArgAsnLe uSerGlnGlu Thr
1101 CTGTTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AACTCTACCG CCCCTCATCC AGTCACAATG TACCCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG

1201 GGCACCTGGCC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT

1301 AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAAACCT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA

1401 TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTTGAA AATCACTAAT TCT

```

FIG. 16B


```

1  gagtccttgccccacacctctctccaccgcgactctgccgaaagaagcacagaaagctcaagccgcctccatggccccaggaaagattcaggggagagggcccc
    -20
101 atacagggagaccacttcagttagacaccctggccagaATGGAGCTGACTGATTGCTCCTGGGGGCCATGCTTCTTGCCAGTGGCAAGACTAACTCTGTCC
    MetGluLeuThrAspLeuLeuLeuAlaAlaMetLeuLeuAlaValAlaArgLeuThrLeuSer
    -10
    • 30
    SerProValAlaProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisLeuLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProAspValAspPro
201 AGCCCCGTAGCTCCTGCCTGTGACCCCCAGACTCCTAAATAAAGTGGTGGTGACTCCACCTCCTTCACAGCCGACTGAGTCAGTGTCCCGACGTCGACC
    40
    LeuSerIleProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnSerLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal
301 CTTTGCTATCCCTGTTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCCTGGGAGAAATGGAAACCCAGACGGAACAGCAGGACATTTCTAGGGGCAGT
    60
    SerLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGluProSerCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
401 GTCCCTTCTACTGGAGGGAGTGATGGCAGCAGCAGGACAGTTGGAAACCTCCTGCTCATCCCTCCTGGGACAGCTTTCTGGGCAGGTTTGGCCTCCTC
    80
    LeuGlyAlaLeuGlnGlyLeuLeuGlyThrGlnLeuProLeuGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaLeuPheLeuSerLeuGlnGlnLeu
501 TTGGGGGCCCTGCAGGGCCTCCTAGGAACCCAGCTTCCCTCTACAGGGCAGGACACAGCTCACAAGGACCCCAATGCCCTCTTCTTGAGCTTGCAACAAC
    100
    110
    120
    130
    LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuValGluGlyProThrLeuCysValArgArgThrLeuProThrThrAlaValProSerSerThrSerGln
601 TGCTTCGGGGAAAGGTGCGCTTCCCTGCTTCTGGTAGAAGGTCCCACCCCTCTGTGTCAGACGGACCCCTGCCCAACCCACAGCTGTCCCAAGCAGTACTTCTCA
    140
    150
    160
    LeuLeuThrLeuAsnLysPheProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheSerValThrAlaArgThrAlaGlyProGlyLeuLeuSerArg
701 ACTCCTCACACTAAACAAGTTCCCAACACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACGGAACCTTCAGTGTACAGCCAGCAACTGCTGGCCCTGGACTTCTGAGCAGG
    170
    180
    190
    200

```

FIG. 17A

```

      210      220      230
LeuGlnGlyPheArgValLysIleThrProGlyGlnLeu[AsnGlnThr]SerArgSerProValGlnIleSerGlyTyrLeu[AsnArgThr]HisGlyProVal
801 CTTCAGGGATTTCAGAGTCAAGATTACTCTGGTCAGCTAAATCAAACCTCCAGGTCCCAGTCCAAATCTCTGGATACCTGAACAGGACACACGGACCTG

      240      250      260
[AsnGlyThr]HisGlyLeuPheAlaGlyThrSerLeuGlnThrLeuGluAlaSerAspIleSerProGlyAlaPheAsnLysGlySerLeuAlaPheAsn
901 TGAATGGAACTCATGGGCTCTTTGCTGGAACTCACTTCAGACCCCTGGAAGCCTCAGACATCTCGCCCCGAGCTTTCAACAAGGCTCCCTGGCATTCAA

      270      280      290
LeuGlnGlyGlyLeuProSerProSerLeuAlaProAspGlyHisThrPropheProProSerProAlaLeuProThrThrHisGlySerProPro
1001 CCTCCAGGGTGGACTTCCTCCTTCTCCAAGCCTTGCTCCTGATGGACACACACACCCCTTCCCTTCACCTGCCCTGGCCACCCACCCATGGATCTCCACCC

      310      320      330
GlnLeuHisProLeuPheProAspProSerThrThrMetPro[AsnSerThr]AlaProHisProValThrMetTyrProHisProArg[AsnLeuSer]GlnGlu
1101 CAGCTCCACCCCTGTTCTCTGACCCCTTCCACCAACCATGCCTAACTCTACCGCCCCCTCATCCAGTCACAATGTACCCCTCATCCAGGAATTTGTCTCAGG

Thr
1201 AAACATAGcggggcactggcccagtgagcgtctgcagcttctctcggggacaaagcttccccagggaagctgagaggcagctgcatctgctccagatggtt

1301 ctgctttcacctaaaaggccctggggaaagggatacacagcactggagattgtaaaaatttttagggagctatttttttttaacctatcagcaatatattcatcag

1401 agcagctagcgatcttttggtctatttttcggtataaaatttgaaaaatcactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1501 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

FIG. 17B

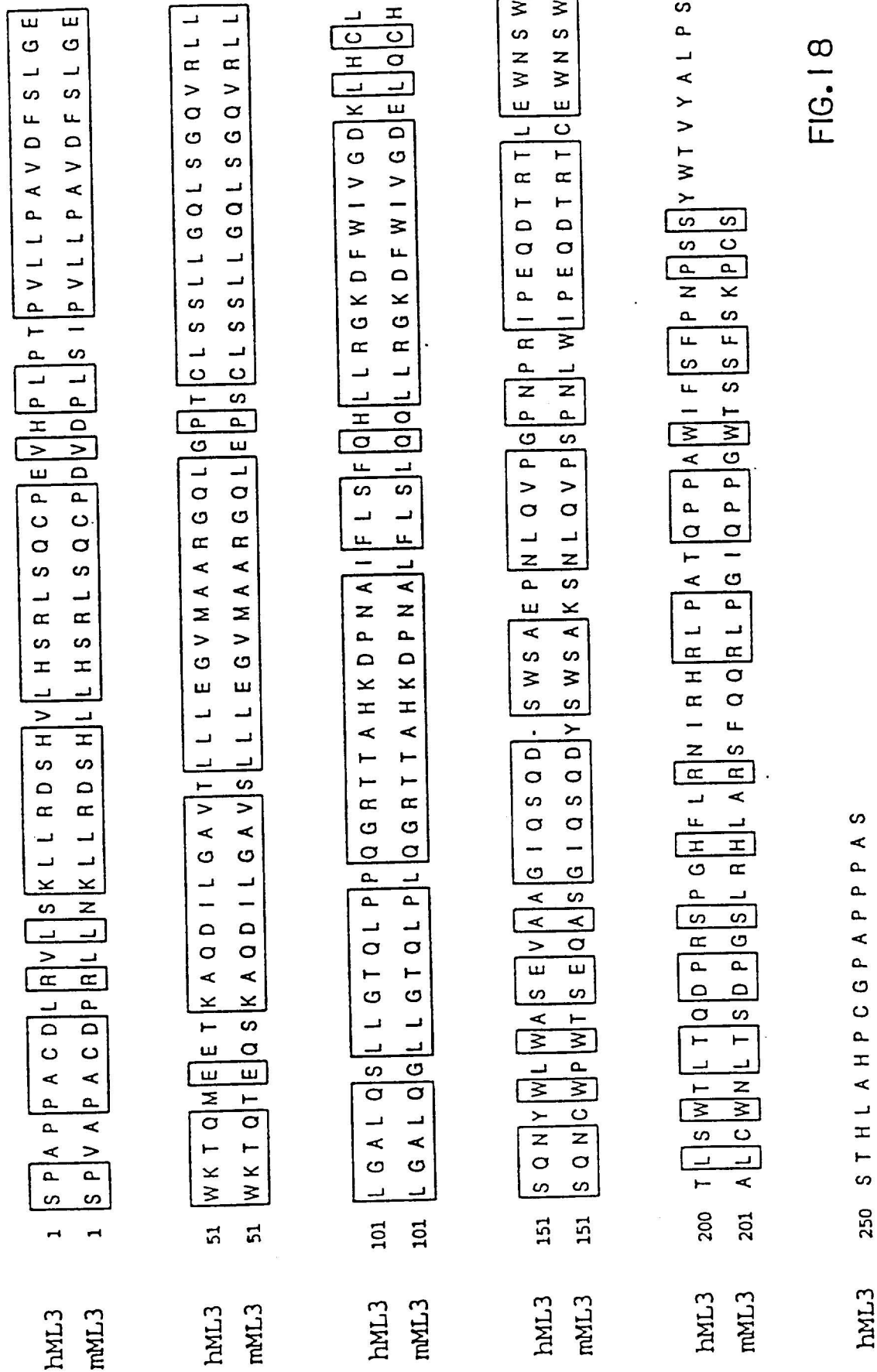


FIG. 18

m-ML	1	SPIVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSSRLSQCPCDVDP	PLSIPVLLPAVDFSLGE
p-ML	1	SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVLHGRLSQCPCDIN	PLSTPVLLPAVDFITLGE
h-ML	1	SPAPPACDLRLVLSKLLRDSHVLHSSRLSQCPEVHP	PLPTPVLLPAVDFSLGE
m-ML	51	WKTEQESKAQDILGAVSLLEGVMAARGQLLEP	CLSSLLGQLSGQVRL
p-ML	51	WKTEQETKAQDVLGATITLLLEAVMTARGQVGP	PCSSLLVQLSGQVRL
h-ML	51	WKTOMEETKAQDILGAVITLLLEGVMAARGQLGPT	CLSSLLGQLSGQVRL
m-ML	101	LGALQGLLGTQLPLQGRITTAHKDPNALFLSL	LQQLLRGKVRFLLLVEGPTL
p-ML	101	LGALQDGLLGMQLPPQGRITTAHKDPNSAIFLNF	QQLLRGKVRFLLLVVGPSL
h-ML	101	LGALQSLLLGTQLPLQGRITTAHKDPNAIFLSFO	HLLRGKVRFLMLVGGSTL
m-ML	151	CVRRITLPTIAVPSSTS	QLLTLNKFFPNTSSGLLEITNFS
p-ML	151	CAKRAPPATIAVPSSTS	PFHTLNKLPNNTSSGLLEITNFS
h-ML	151	CVRRAPPPTIAVPSRTS	LVLTNLNLPNNTSSGLLEITNFS
m-ML	201	LQGFRTVKITPGQLNQDTSRSRPVQISGYLNR	ITHHGPPVNGITHGLFAGITSLQITL
p-ML	201	LQAFRAKIPGLL	NRSLDQIPGHQNGITHGPPVLSGIHGLFPGPQPGALG
h-ML	201	QQGFRAKIPGLL	NRSLDQIPGYLNRITHELNIGTRGLFPGPSRRITLG
m-ML	251	ASDISPGAFNKGSLAFNLQGLPPSPSLAPDGH	TTPFPSPALPTTHGSP
p-ML	250	APDIPTATSGMGSRPITYLQPGESPSPAHPS	PGRYITLFSPTSPTS
h-ML	250	APDISGTSDTGSLPPNLOPGYSPSPTHPP	PTGTGYITLFPPLPT
m-ML	300	PQLHPLFPDPSITIMP	NLSAAPHVPVIMYPHPRNLSQET
p-ML	297	VQLQPLLPDPSAITPT	HLGSSPLLFAAHPHFQNLSSQEE
h-ML	297	VQLHPLLPDPSAPTPT	PTPTSPLLNLSYTHSQNLSQEE

FIG. 19

```

      10      20      30
SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro
1  AGCCCGGCTCCTGCCTGTGACCCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGCTGACTCCCATGTCTTACGGCAGACTGAGCCAGTGCCCGACAGACATTAACC

      40      50      60
LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAlaAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr
101 CTTTGTCCACACCTGTCTGCTGCTGCTGTGGACTTCACCTTGGGAGAATGGAAAAACCCAGACGGAGCAGACAAAAGGCACAGGATGTCTCTGGGAGCCAC

      70      80      90
ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu
201 AACCCCTTCTGCTGGAGGCAGTGATGACACAGCACGGGACCAAGTGGGACCCCTTGCCCTCTCATCCCTGCTGGTGCAGCTTTCTTGGACAGGTTCGCCCTCCTC

      110      120      130
LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeu
301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGGAATGCAGCTTCCTCCACAGGGAAGGACCCACAGCTCACAAAGGATCCCGAGTGCCCATCTTCTTGAACTTCCAACAAC

      140      150      160
LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerPro
401 TGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCTCTGCTGCTGCTGTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGCCCATAGCTGTCCCGAGCAGCACCTCTCC

```

FIG.20A

```

170
PheHisThrLeuAsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArg      200
501 ATTCACACACTGAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTTGGAGACAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTCTCTCAAGAGG      190

LeuGlnAlaPheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSer      230
601 CTGCAGGCATTTCAGAGCCCAAGATTCTTGCTGCTGTAACCAACCTCCAGGTCCCTAGACCAAATCCCTGGACACCCAGAAATGGGACACACGACCCCTTGA      220

GlyIleHisGlyLeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeu      260
701 GTGGAATTCAATGGACTCTTTCTCTGGACCCCAACCCGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCCTCCAGCAACTTCAGGCAATGGGCTCCCCGGCCCAACCTACCT      250

GlnProGlyGluSerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProThrValGlnLeuGln      300
801 CCAGCCTGGAGAGTCTCCTTCCCCCAGCTCACCCCTTCTCCTGGACGATACACTCTCTCTCTCCTTCACCCACCTCGGCCCTCCCCCACAGTCCAGCTCCAG      290

ProLeuLeuProAspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu      330
901 CCTCTGCTTCCTGACCCCTCTGCGATCACACCCCAACTCTACCAGTCCCTCTTCTATTTCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAG      320

1001 GTGCTCAGACCCCTGCCAACTTCAGCA

```

FIG.20B

1001 GTGCTCAGACCCCTGCCAACTTCAGCA

FIG. 21 A

```

170                                     180                                     190                                     200
AsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArgLeuGlnAlaPhe
501 GAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTTGGAGACAAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTCTCAAGAGGCTGCAGGCATTC

ArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSerGlyIleHisGly
601 AGAGCCAAAGATTCTGGTCTGCTGTAACCAAAACCTCCAGGTCCCTAGACCAAAATCCCTGGACACACCAGAAATGGGACACACACGGACCCCTTGAGTGAATTCATG

LeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeuGlnProGlyGlu
701 GACTCTTTCCCTGGACCCCAACCCGGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGCCAACTACCTCCAGCCTGGAGA

SerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProSerProThrValGlnLeuGlnProLeuLeuPro
801 GTCTCCTTCCCCAGCTCACCCCTTCTCCTGGACGATACACTCTCTCTCTCCTTCACCCACCTCGCCCTCCCCACAGTCCAGCTCCAGCCTCTGCTTCCT

AspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu
901 GACCCCTCTGCGATCACACCCAACTCTACCAAGTCCCTCTCTATTGTCAGCTCACCCCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAGGTGCTCAGACCCC

1001 TGCCAACTTCAGCA

```

FIG.2 | B

pML	1	SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVLHGRLSQCPDINPLSTPVLLPAVDFTLGE
pML2	1	SPAPPACDPRLLNKLLRDSHVLHGRLSQCPDINPLSTPVLLPAVDFTLGE
pML	51	WKTQTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGPPCLSSLVQLSGQVRL
pML2	51	WKTQTEQTKAQDVLGATTLLEAVMTARGQVGPPCLSSLVQLSGQVRL
pML	101	L G A L Q D L L G M Q L P P Q G R T T A H K D P S A I F L N F Q Q L L R G K V R F L L L V V G P S L
pML2	101	L G A L Q D L L G M Q G R T T A H K D P S A I F L N F Q Q L L R G K V R F L L L V V G P S L
pML	151	C A K R A P P A I A V P S S T S P F H T L N K L P N R T S G L L E T N S S I S A R T T G S G F L K R
pML2	147	C A K R A P P A I A V P S S T S P F H T L N K L P N R T S G L L E T N S S I S A R T T G S G F L K R
pML	201	L Q A F R A K I P G L L N Q T S R S L D Q I P G H Q N G T H G P L S G I H G L F P G P Q P G A L G A
pML2	197	L Q A F R A K I P G L L N Q T S R S L D Q I P G H Q N G T H G P L S G I H G L F P G P Q P G A L G A
pML	251	P D I P P A T S G M G S R P T Y L Q P G E S P S P A H P S P G R Y T L F S P S P T S P S P T V Q L Q
pML2	247	P D I P P A T S G M G S R P T Y L Q P G E S P S P A H P S P G R Y T L F S P S P T S P S P T V Q L Q
pML	301	P L L P D P S A I T P N S T S P L L F A A H P H F Q N L S Q E E
pML2	297	P L L P D P S A I T P N S T S P L L F A A H P H F Q N L S Q E E

FIG.22

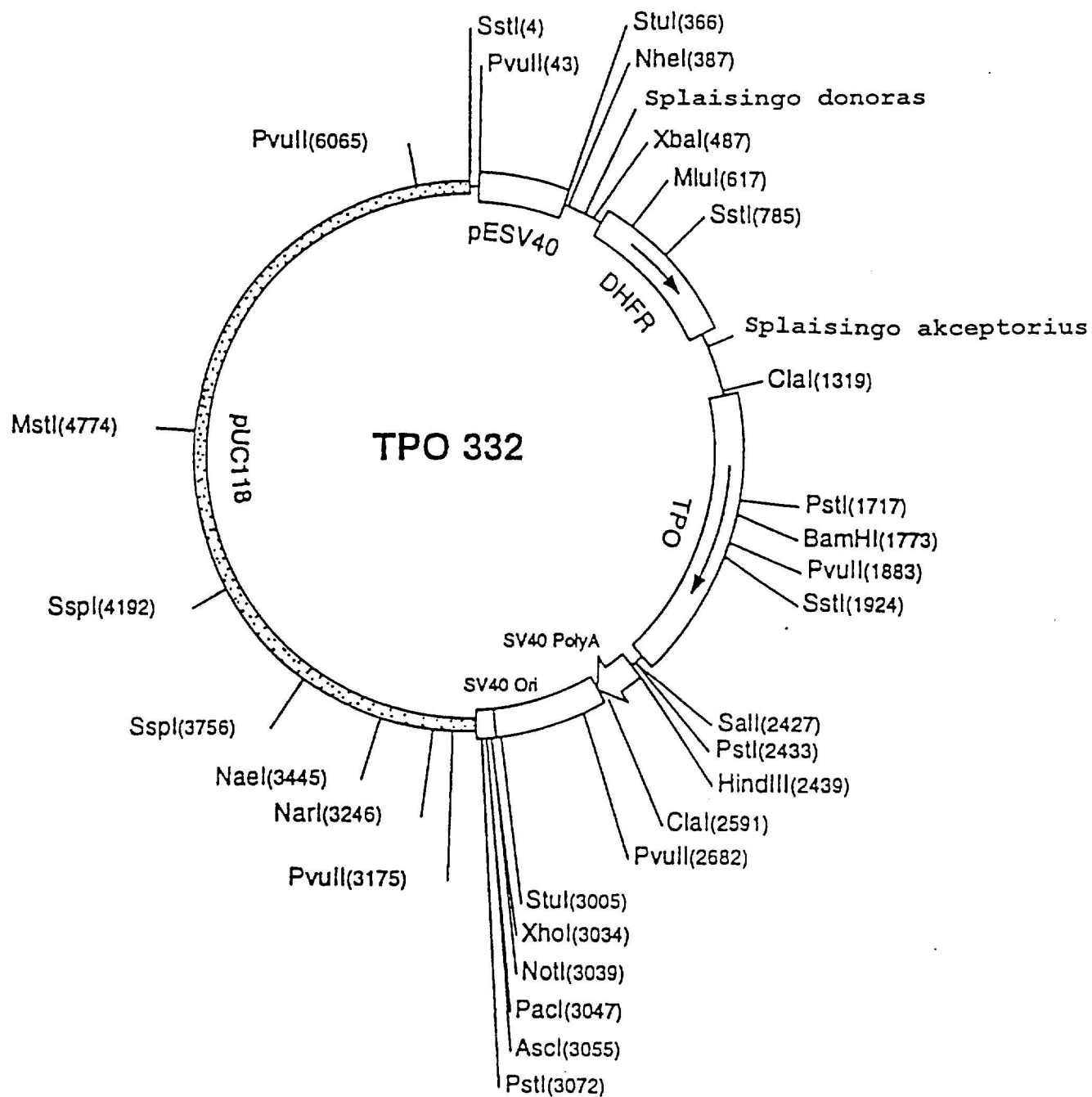


FIG.23

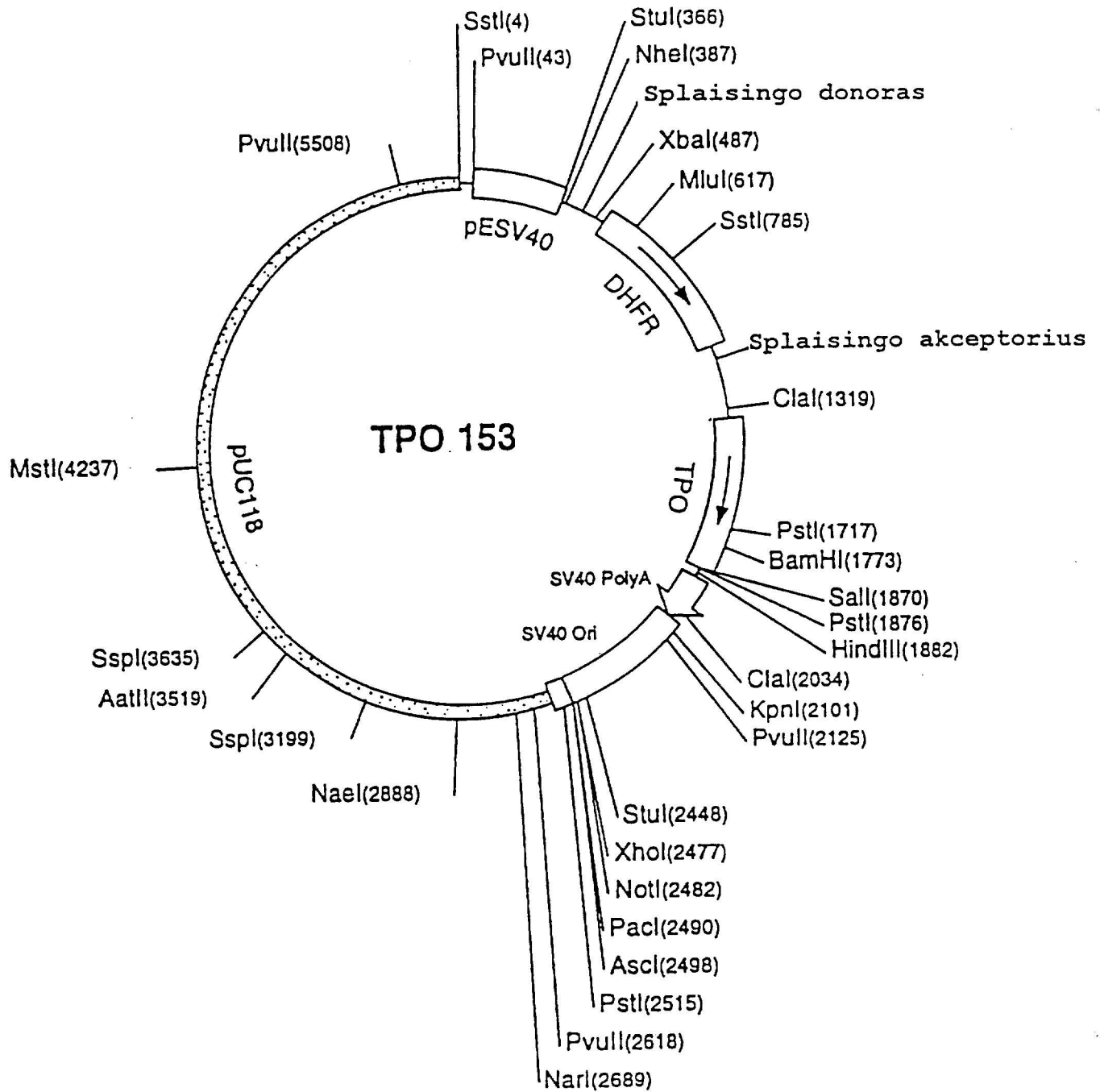


FIG.24

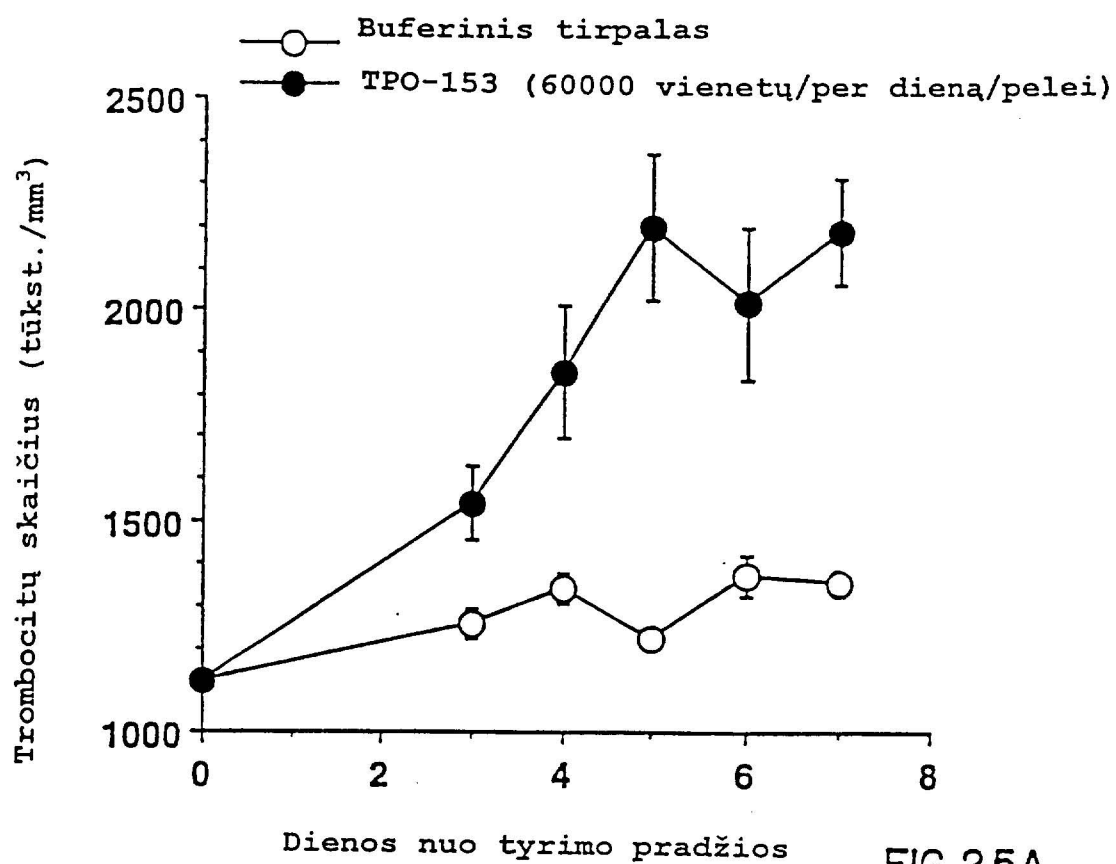


FIG.25A

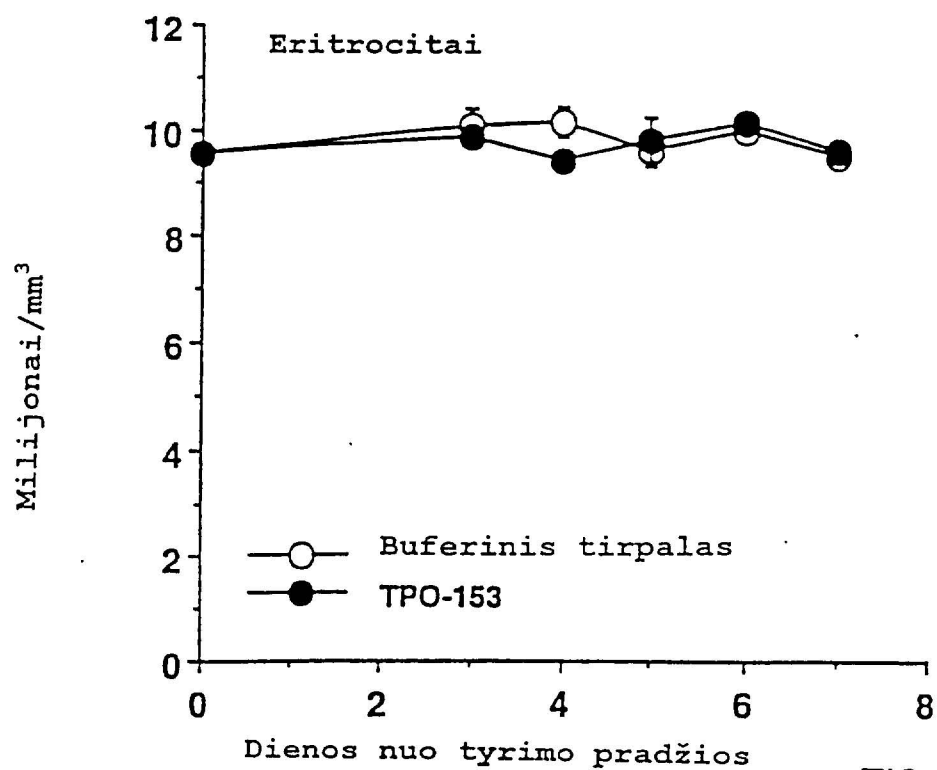


FIG.25B

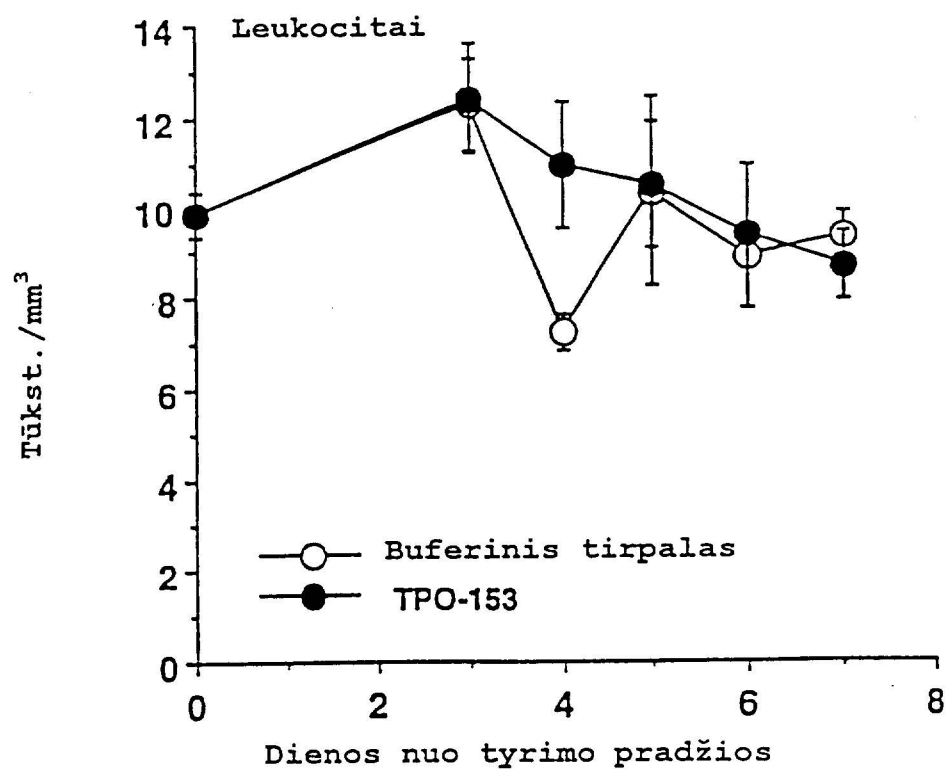


FIG.25C

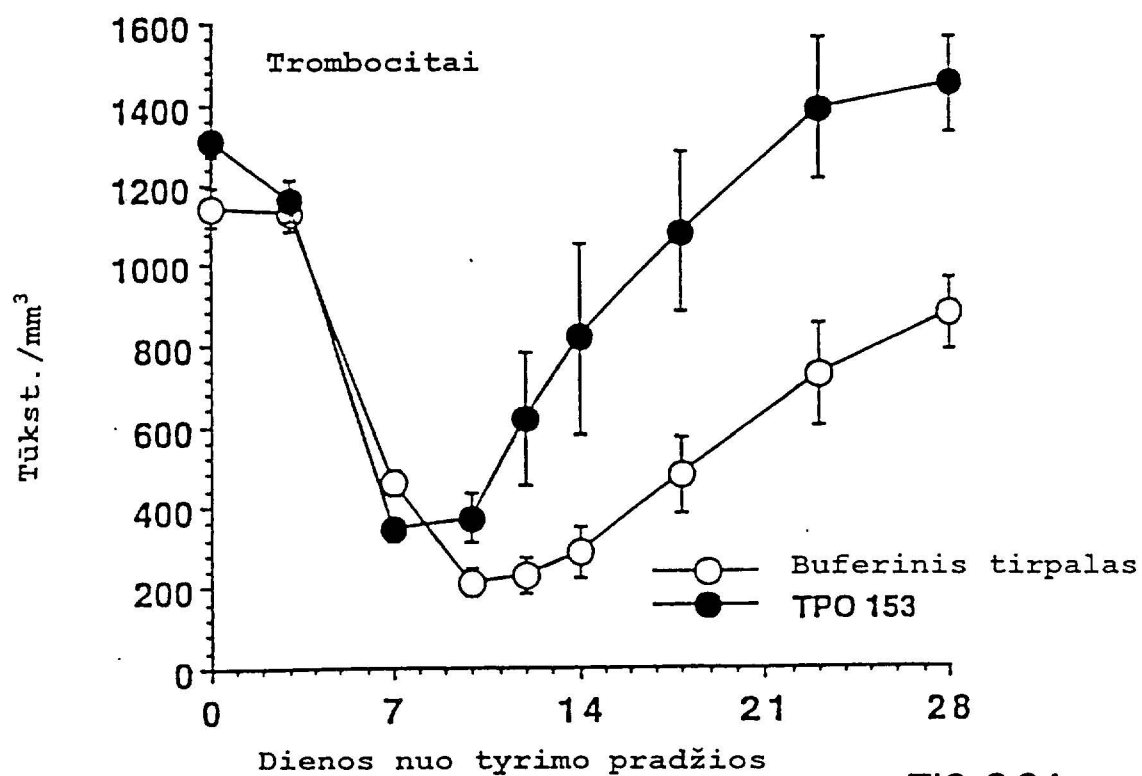


FIG.26A

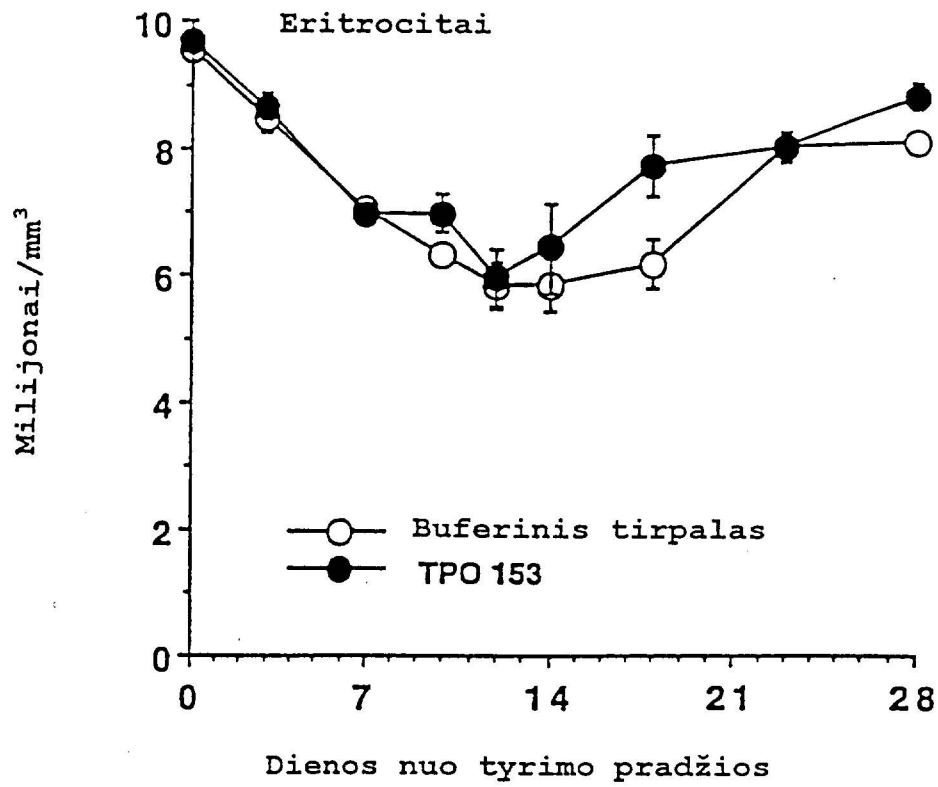


FIG.26B

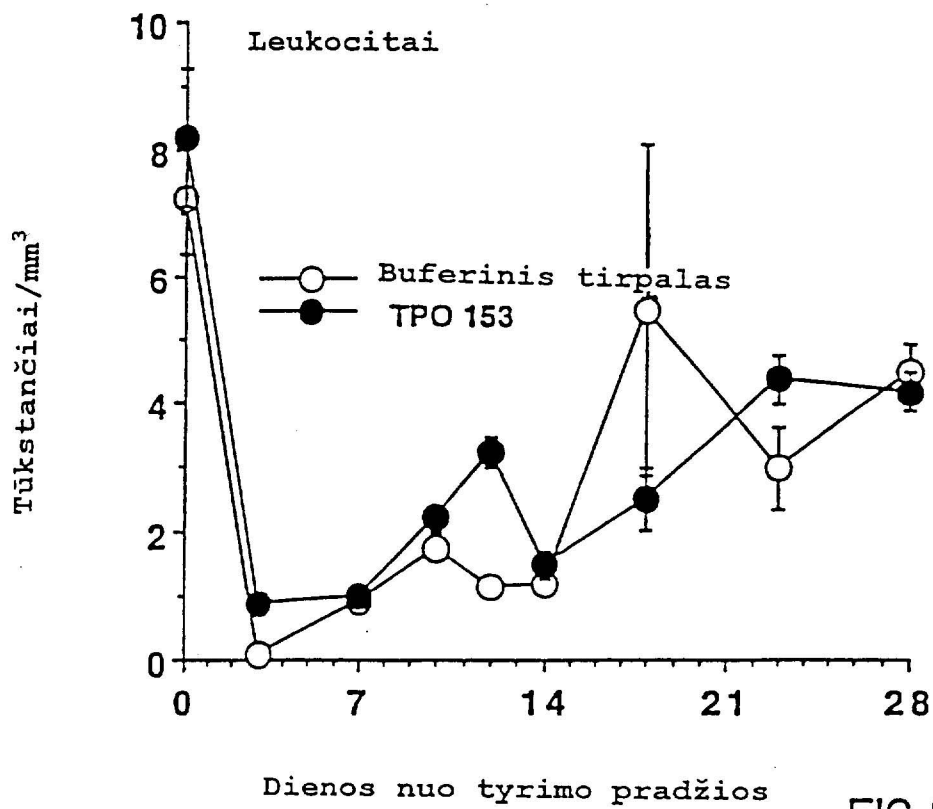


FIG.26C

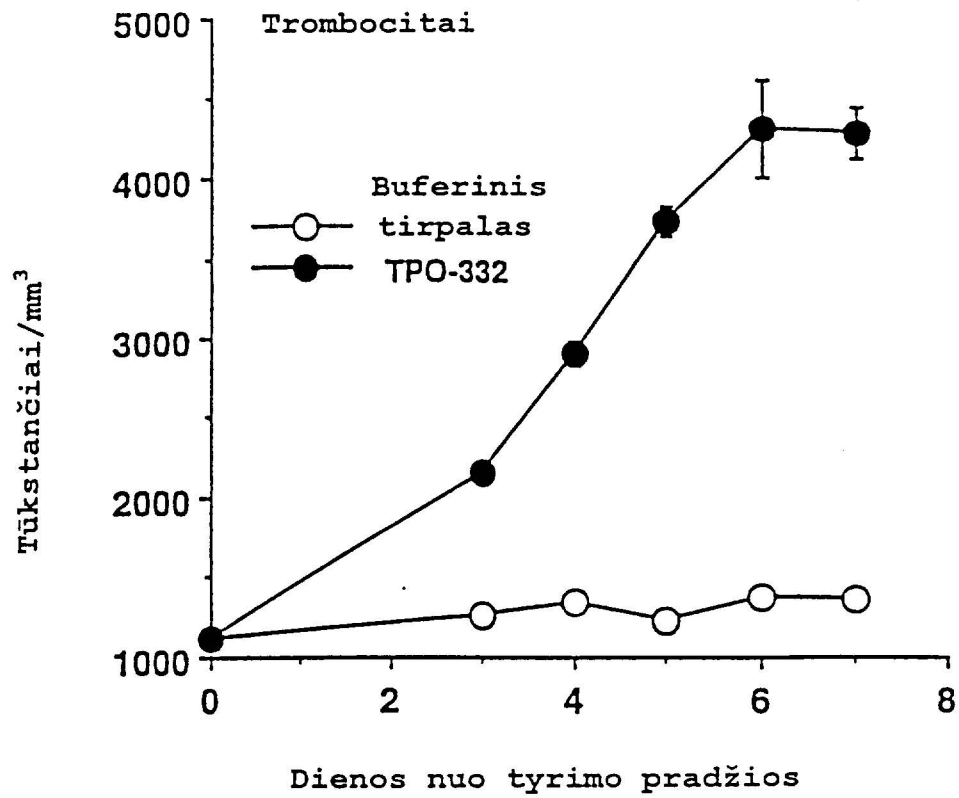


FIG.27A

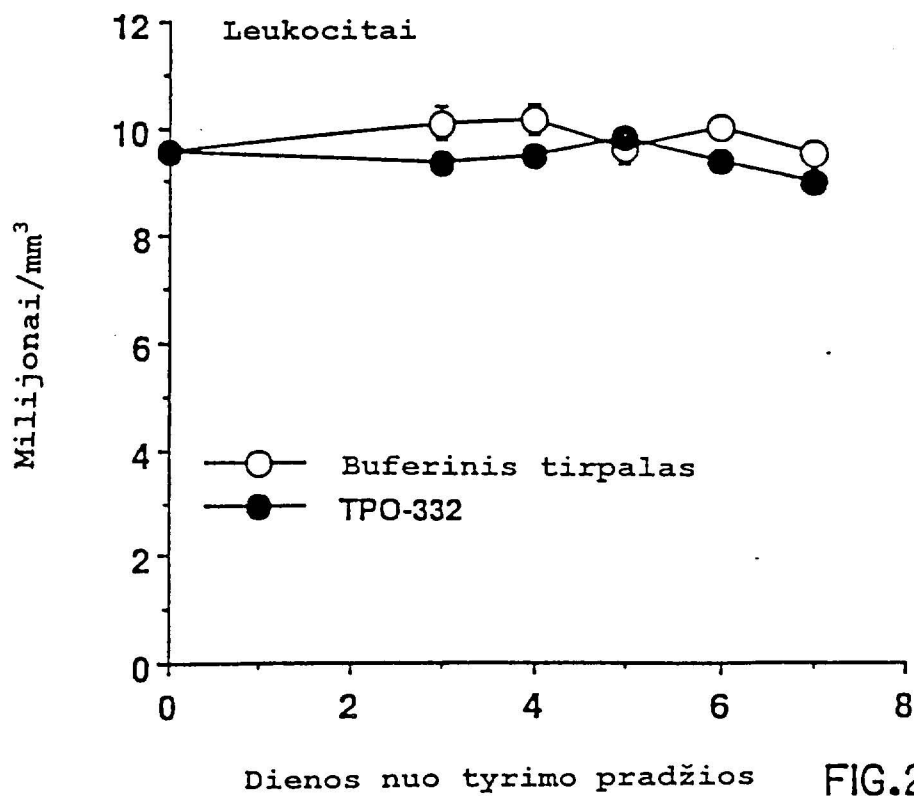


FIG.27B

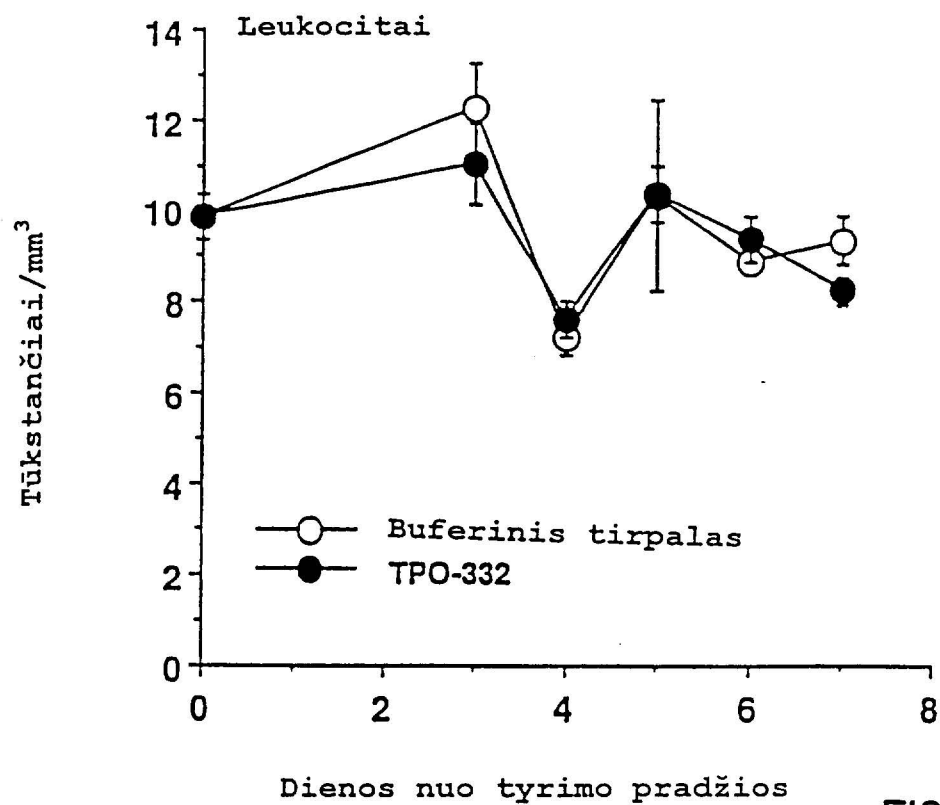


FIG.27C

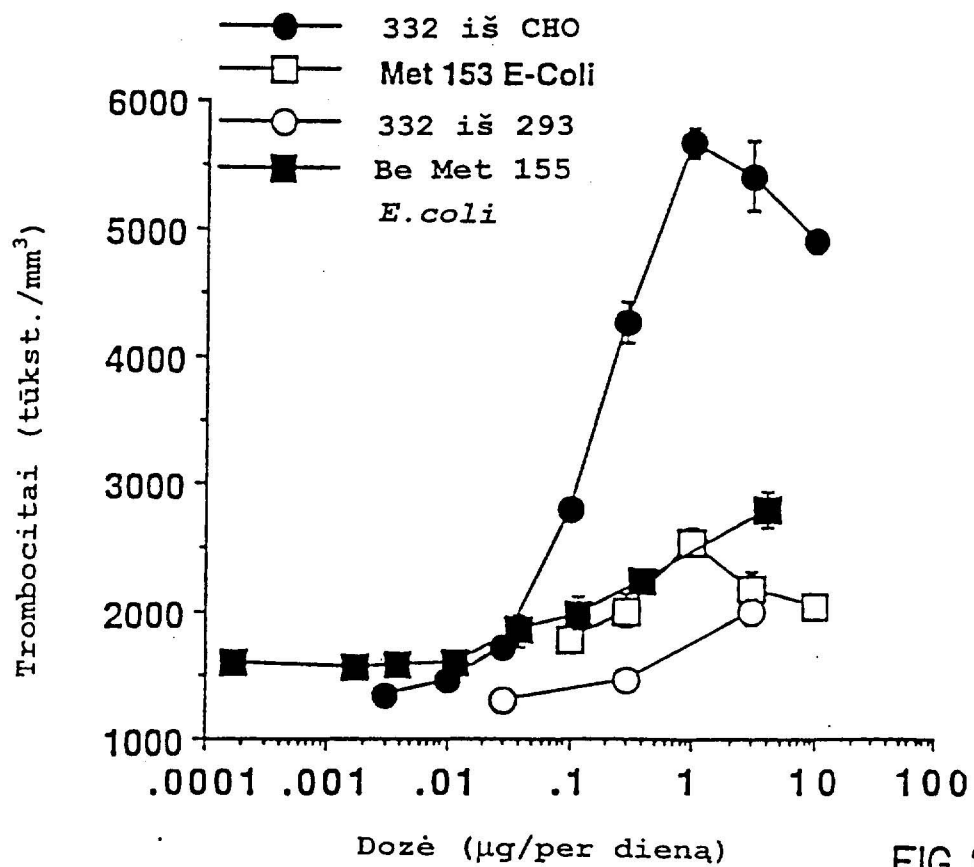


FIG.28

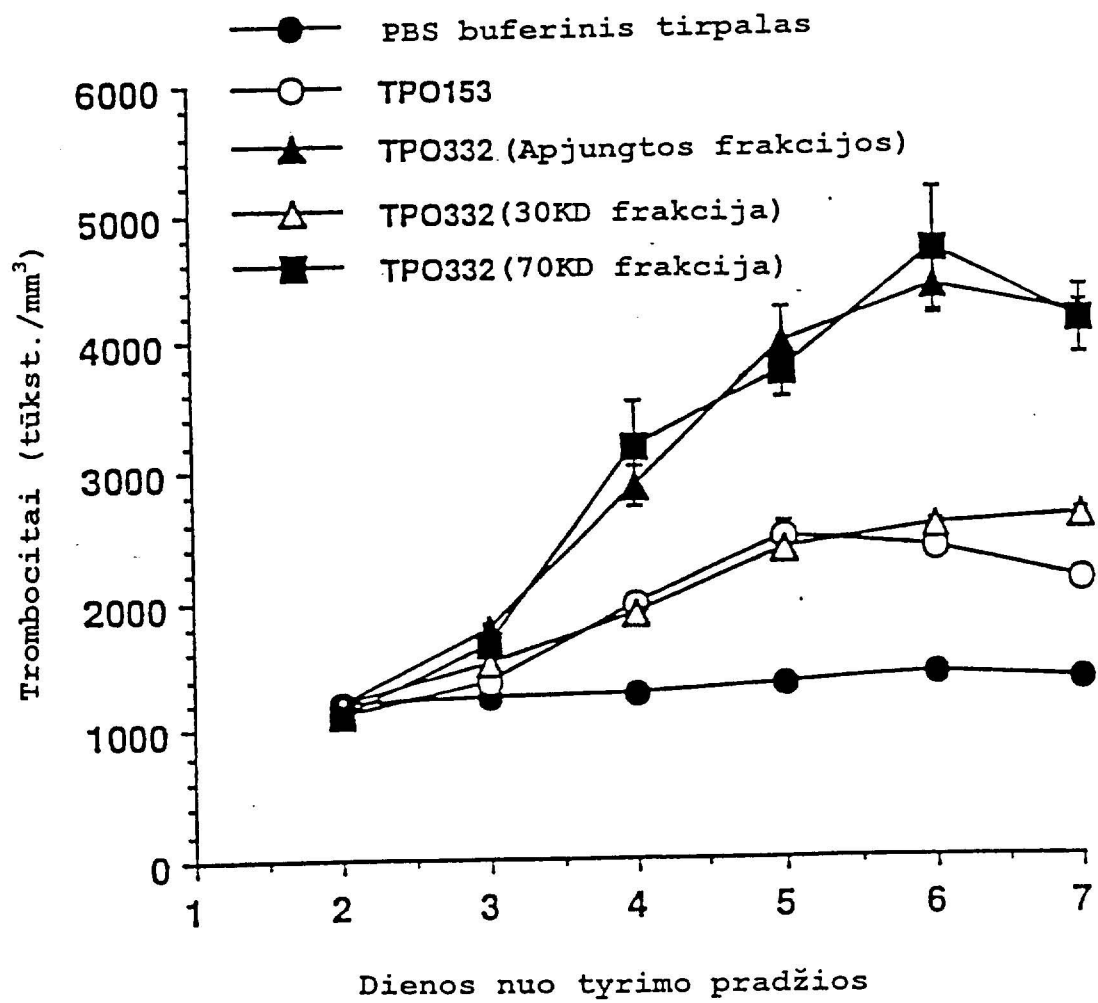
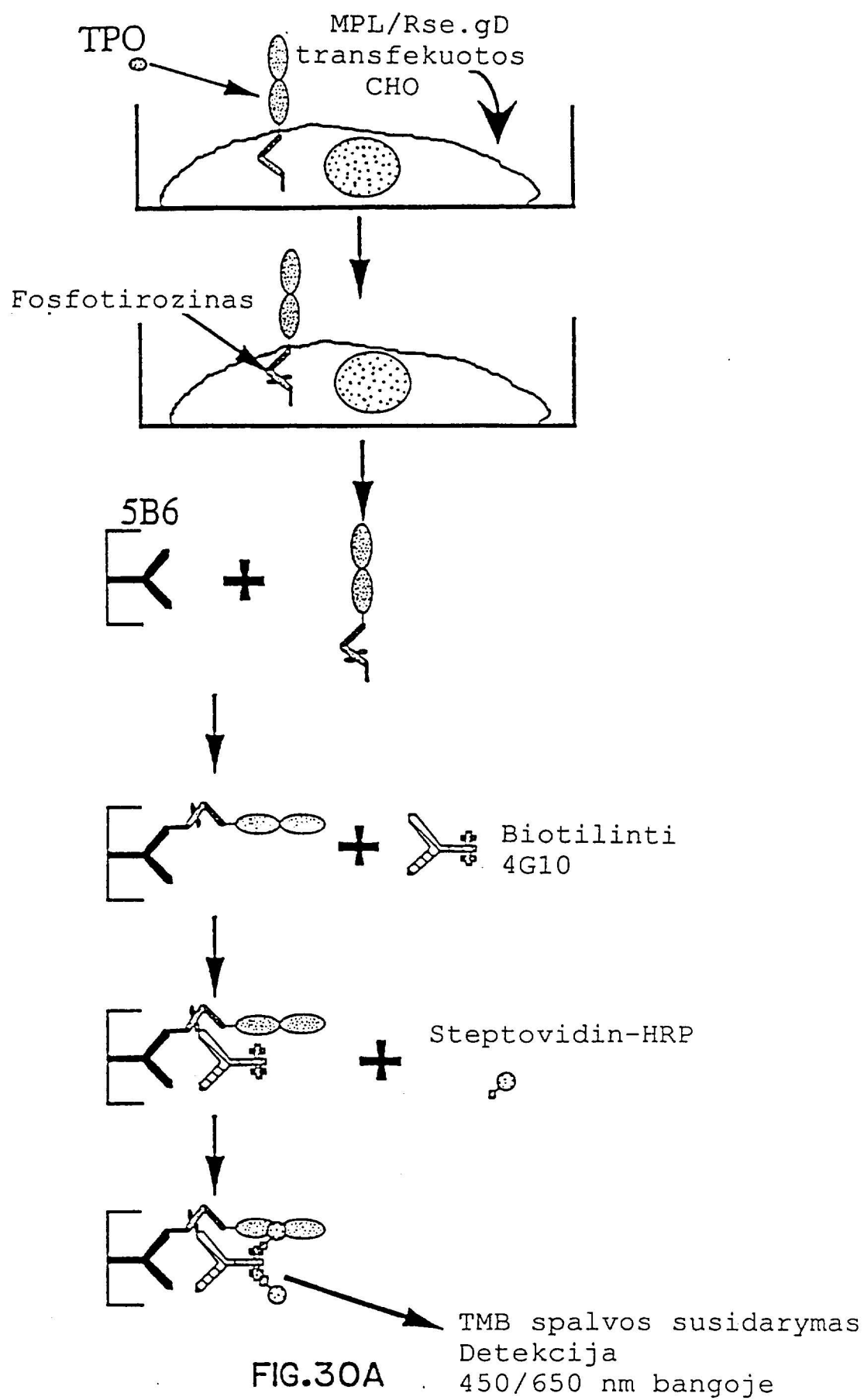


FIG.29



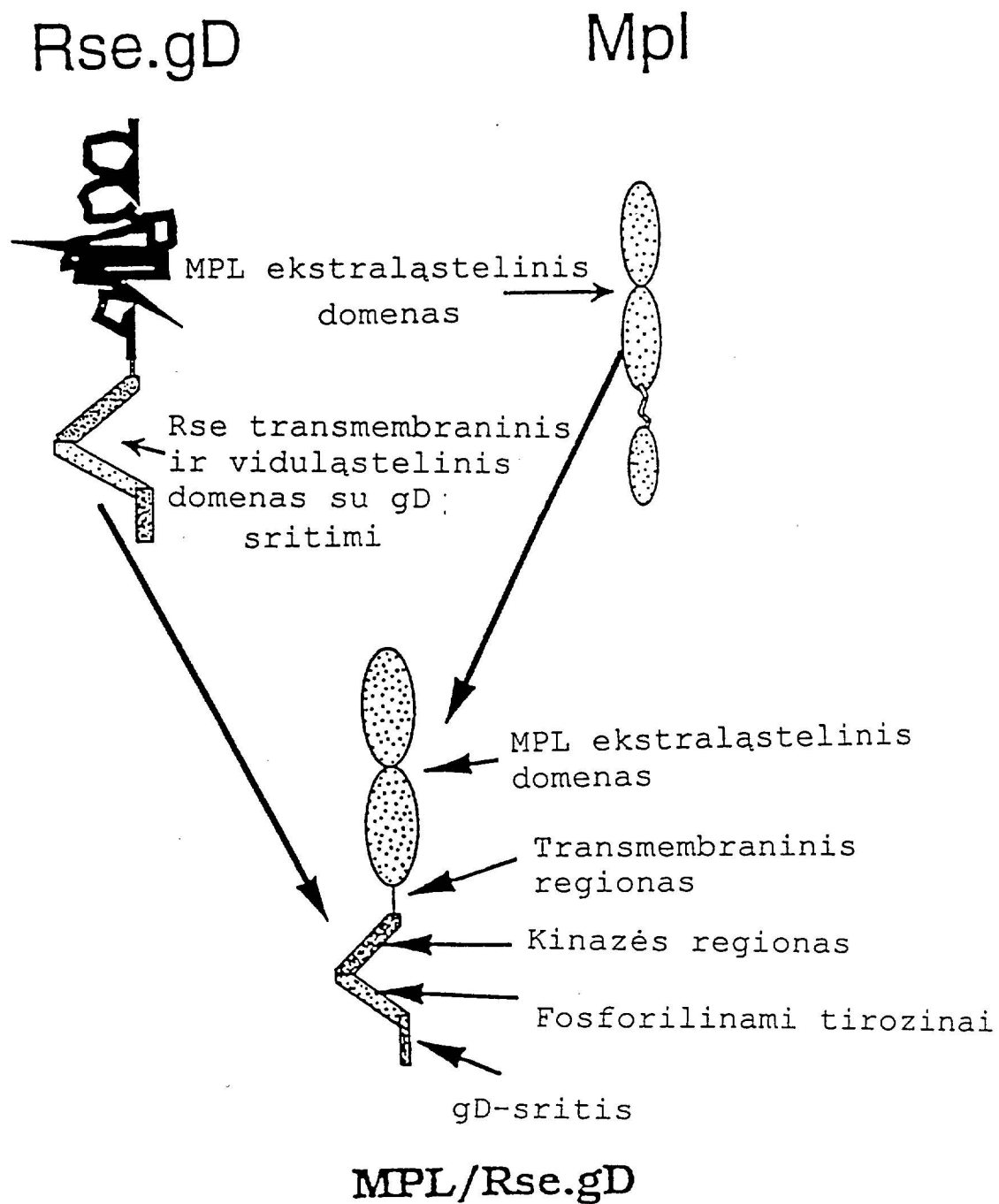


FIG.30B

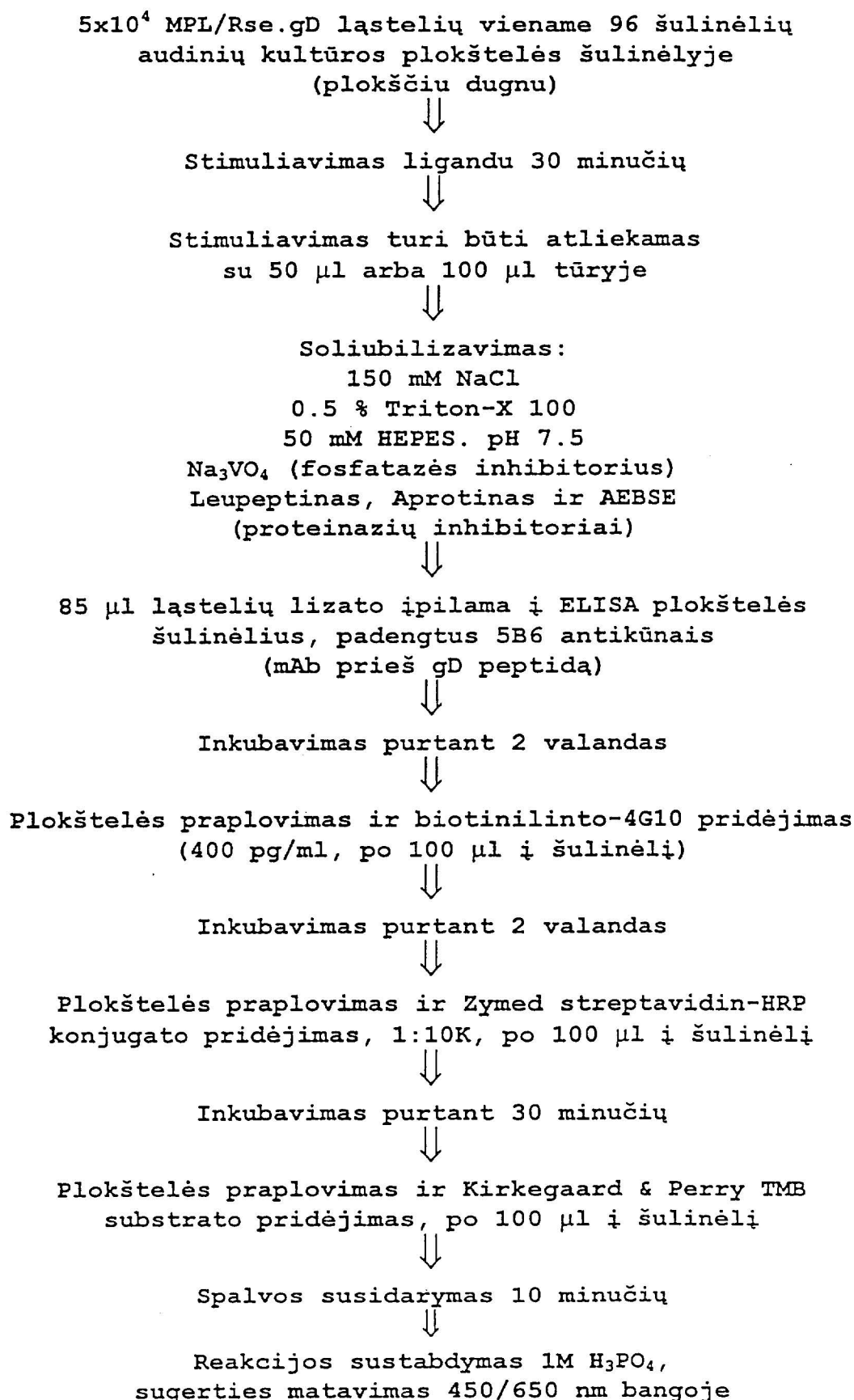


FIG. 31

```

aluI
sstI
sacI
hgiJII
hgiAI/aspHI
ec1136II
bsp1286
bsiHKAI
bmyI
banII
    aluI
    sau3AI pvuII
    mboI/ndeII[dam-]
    dpnI[dam+]
    pvuI/bspCI
    pleI dpnII[dam-]
    hinfI taqI[dam-]
    rmaI mcrI nspBII
    maeI taqI[dam-]
    taqI
1  TTCGAGCTCG CCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT
   AAGCTCGAGC GGGCTGTAAC TAATAACTGA TCTCAGCTAG CTGTCGACAC CTTACACACA GTCAATCCCA

nlaIV
scrFI
mvaI
ecorII
dsaV
bstNI
apyI[dcm+]
bsaJI
    nlaIII
    sphI
    nspI
    nspHI
    scrFI
    mvaI
    ecorII
    dsaV
    bstNI
    apyI
    sexAI
71 GTGGAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG
   CACCTTTCAG GGGTCCGAGG GGTCGTCGGT CTTCATACGT TTCGTACGTA GAGTTAATCA GTCGTTGGTC

```

FIG.32A

```

nlaIV
scrFI          sfaNI          ppulOI
              mvaI          nsII/avaIII
              ecorII         nlaIII
              dsav          bstNI          sphI
              [dcm+]        apyI[dcm+]      nspI
              bsaJI        nspHI
141 GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
    CACACCTTC AGGGGTCCGA GGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG
              aciI          foki          aciI          bsrI          aciI          bsaJI
211 ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCCATGTC CGCCCATCTT CCGCCCCATG
    TATCAGGGCG GGGATTGAGG CGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGGTAC
              aciI          fnu4HI          bglI          sfiI          haeIII/palI
              aciI          mnlI          mnlI          mnlI          ddeI
              haeIII/palI bsaJI mnlI aluI
              mnlI bsaJI aciI haeIII/palI
281 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG
    CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC
              mnlI

```

FIG.32B

```

rmaI      haeIII/palI
styI      mcrI
bsaJI     eagI/xmaIII/eclXI
blnI      eaeI
avrII     cfrI
haeIII/palI  mspI
stuI      nheI
haeI      hpaII
mnII maeI  aluI
          rmaI
          maeI
          nheI
          aluI
351 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAGCTA GCTTATCCGG
    TCCTCCGAAA AACCTCCGG ATCCGAAAC GTTTTCGAT CGAATAGGCC

          tfil
          hinFI
scrFI     aciI
nciI      thaI
mspi      fnuDII/mvnI
hpaII     bstUI
dsaV      bsh1236I
cauII     CGCGGACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA GTACCGCCTA TAGAGCGATA
401 GGCCCTTGCC ACGTAACCTT GCGCCTAAGG GGCACGGTTC TCACTGCATT CATGGCGGAT ATCTCGCTAT
          maeII  rsal
          maeIII csp6I scfI
          ^Splaisingo donoras

          fnu4HI
          bbvI
          nspBII
          aciI
          nlaIII taqI
          sfaNI
          pflMI
          bslI
          mnII
471 AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAAATATG
    TCTCCTAAA TAGGGGCGAC GGTAGTACCA AGCTGGTAAC TTGACGTAGC AGCGGCACAG GGTTTATAC
          DHER ATG^

```

FIG.32C

```

haeIII/palI
haeI
scrFI
mvaI      bsrBI
ecorII
dsav
bstNI     acilI      rsaI
          apyI[dcm+]  csp6I
          bsaJI mnlI ddeI xmnI      asp700  scaI
541 GGGATTGGCA AGAACGGAGA CCTACCCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC CAAAGAAATGA
    CCCTAACCGT TCTTGCCCTCT GGATGGGACC GGAGGCGAGT CCTTGCTCAA GTTCATGAAG GTTCTCTTACT

eco57I
mboII
earI/ksp632I
mnlI
tfil      tfil      hinfI      alwNI      hphI      ddeI
611 CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC
    GGTGTTGGAG AAGTCACCTT CCATTGTCT TAGACCACCTA ATACCCATCC TTTTGGACCA AGAGGTAAGG

tfil      tru9I      msei      msei      ddeI
681 TGAGAAGAAT CGACCTTTAA AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA
    ACTCTTCTTA GCTGGAAATT TCCTGTCTTA ATTATATCAA GAGTCATCTC TTGAGTTTCT TGGTGGTGCT

```

FIG.32D

FIG. 32F

```

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
apyI[dcm+]
sau96I
avaII
asuI      mnII      sfanI      accI      mboII      sfanI      mboII
1001 AGGTC CAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAAGT CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC
      TCCAGGTCCT CCTTTTCCG TAGTTCATAT TCAAACTTCA GATGCTCTC TTCTGTGATTG TCCTTCTACG
                                     ^DHFR galas

                                     nlaIII
                                     styI
                                     ncoI
                                     dsal
                                     ppulOI
                                     aluI      nsII/avaIII      bsal
                                     mnII
1071 TTTC AAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT ATGCATTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG
      AAAGTTCAAG AGACGAGGGG AGGATTTCGA TACGTAAAAA TATTCTGGTA CCCTGAAAAAC

```

FIG.32G

```

          styI
          bsaJI
          sau3AI
          mboI/ndeII[dam-]
          dpnI[dam+]
          dpnII[dam-]
          alwI[dam-]
          bstYI/xhoII
1131 CTGGCTTTAG ATCCCCTTGG CTTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATACAC
      GACCGAAATC TAGGGAACC GAAGCAATCT TGCGCCGATG TTAATTATGT ATTGAATAC ATAGTATGTG

          fnu4HI
          aciI
          thal
          fnuDII/mvnI tru9I
          bstUI mseI
          bsh1236I aseI/asnI/vspI
          1201 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA CAGGTGTCCA CTCCCAGGTC
      TATGCTAAAT CCACTGTGAT ATCTATTGTA GGTGAAACGG AAAGAGAGGT GTCCACAGGT GAGGGTCCAG

          maeIII
          hphI scfI fokI
          sau96I
          avaII
          asuI
          scrFI
          mvaI
          ecorII
          dsav
          bstNI
          apyI[dcn+]
          bsaJI
          bslI

```

FIG.32H

```

scrFI
nciI
mspi
hpaII
dsav
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
nciI
dsav
cauII
bsaJI
avaI
sau3AI
mboI/ndeII(dam-)
dpmI(dam+)
dpmII(dam-)
pleI
nlaIV cauII
bstYI/xhoII
tagI rmaI bamHI bsaJI
sali maeI alwI(dam-)
hincII/hindII alwI(dam-)
accI xbaI mnlI bsaJI
GTCGACTCTA GAGGATCCCC
CAGCTGAGAT CTCCTAGGGG
1271 CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG
GTTGACGTGG AGCCAAGATT CGAAGACGTC

```

FIG.32I

```

sau96I
    aciI   haeIII/palI
    fnu4HI  asuI
    bglI   nlaIII
    sfiI   styI
    eaeI   ncoI
    cfrI   dsal
    ecoRI  taqI haeIII/palI
    apoI   clai/bsp106 bsaJI
1321 GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
    CCCCTTAAGT TAGTACCGG CCGTACCGGG TTGAACAAAT AACGTCGAAT ATTACCAATG TTTATTTCGT
    ^ sv40 akstyvasis polia

    aluI
    fnu4HI
    bbvI
    maeIII

    rmaI
    bsmI maeI
1391 ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTCACCT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACTCAT
    TATCGTAGTG TTTAAAGTGT TTATTTCGTA AAAAAAGTGA CGTAAGATCA ACACCAAACA GGTTTGAGTA

```

FIG.32J

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+]
dpnII[dam-]
pvuI/bspCI
mcrI
taqI[dam-] tru9I
claiI/bsp106[dam-]
sau3AI mseI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] xmnI
dpnII[dam-] aseI/asnI/vspI
nlaiII alwI[dam-] asp700
1461 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAAAT
GTTACATAGA ATAGTACAGA CCTAGCTAGC CCTTAATTAA
sv40 origin^

haeIII/palI
haeI
styI
fnu4HI ncoI
bbvI dsai
hinPI bsaJI
hhaI/cfoI nlaIII
1501 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAGAGGA ACTTGGTTAG GTACCTTCTG AGGCGGAAAG
GCCGCGTCGT GGTACCGGAC TTATTGGAG ACTTCTCCT TGAACCAATC CATGGAAGAC TCCGCCTTTC

rsal
csp6I
nlaIV
kpnI
hgiCI
banI
asp718 mnli
acc65I ddeI aciI

```

FIG.32K

FIG.32L

```
          nlaIV  
scrFI  
mvaI  
ecoRII  
dsaV  
bstNI  
apyI[dcm+]  
bsaJI  
  
1571 AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG TGTGAAAGT CCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC  
      TTGGTCGACA CCTTACACAC AGTCAATCCC ACACCTTTCA GGGTCCGAG GGGTCGTCCG TCTTCATACG  
  
          nlaIV  
sfanI  
ppu10I  
nsII/avaIII  
nlaIII  
sphI  
nspI  
nspHI  
  
          scrFI  
mvaI  
ecoRII  
dsaV  
bstNI  
apyI[dcm+]  
sexAI  
  
1641 AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT  
      TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT CCACACCTTT CAGGGGTCCG AGGGGTCTC CGTCTTCATA  
  
          sfanI  
ppu10I  
nsII/avaIII  
nlaIII  
sphI  
nspI  
nspHI  
  
          aciI  
fokI  
aciI  
  
1711 GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAACTC CGCCCATCCC GCCCCTAACT  
      CGTTTCGTAC GTAGAGTTAA TCAGTCGTTG GTATCAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTAGGG CGGGGATTGA
```



```

nlaIII
styI
ncoI
bsrI      aciI      bsrI      dsal      mnlI
          aciI      aciI      bsaJI      mnlI
1781 CCGCCAGTT CCGCCATTC CCGCCCAT TCCGCCCAT GGCTGACTAA TTTT TTTATGCAGAG
GGCGGTCAA GGCGGTAAG AGCGGGGTA CCGACTGATT AAAAAATA AATACGTCTC

fnu4HI
bglI
sfiI
haeIII/palI      mnlI      ddeI
haeIII/palI      bsaJI      mnlI      aluI
bsaJI      aciI      haeIII/palI
1841 GCCGAGGCCG CCTCGGCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC
CGGCTCCGGC GGAGCCGGAG ACTCGATAAG GTCTTCATCA CTCCTCCGAA AAAACCTCCG

styI
bsaJI
blnI
avrII
haeIII/palI
stuI
haeI
mnlI
mnlI
mnlI

```

FIG.32M

```

          aciI      hinPI
          haeIII/palI  hhaI/cfoI
          mcrI      thaI
          eagI/xmaIII/eclXI fnuDII/mvnI
          taqI eaeI      bstUI      bspMI
          xhoI notI      hinPI      scfI
          paeR7I cfrI      tru9I      hhaI/cfoI tru9I pstI
          avai fnu4HI paci      asci      ahaIII/draI
          mnli aciI      mseI tru9I bsh1236I mseI bsgI
          aluI maeIII bsrBI fnu4HI      mseI bssHII swaI sse8387I
1901 CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG CGCCATTAA ATCCTGCAGG
      GATCCGAAA CGTTTTTCGA CAATGGAGCT CGCCGGCGGAA TTAATTCCGC GCGGTAAATT TAGGACGTCC
      ^pUC118 pradžia
      ^Linearizavimo linkeris iterptas i HpaI sriti

```

```

          scrFI
          mvaI
          ecorII
          dsaV
          bstNI
          apyI[dcM+]      tru9I
          bsajI      maeIII      mseI
          maeII      bsrI      maeIII      maeIII      maeIII
          maeIII      bsrI      maeIII      maeIII      maeIII
          aluI      bsrI      maeIII      maeIII      maeIII
1971 TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGGTAC CCAACTTAAT
      ATTGTCGAAC CGTGACCGGC AGCAAAATGT TGCAGCACTG ACCCTTTTGG GACCGCAATG GGTGAATTA

```

FIG.32N

```

                sau3AI
                sau96I   mboI/ndeII(dam-)
                haeIII/palI
                asuI     dpnI(dam+)
                        mnlI     dpnII(dam-)
                aluI      pvuII   mboII   aciI   pvuI/bspCI
                fnu4HI    bbvI    fokI    earI/ksp632I   mcrI
                CGCCTTGCAG CACATCCCCC CTTGCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCAGAT
                GCGGAACGTC GTGTAGGGGG GAAGCGGTCG ACCGCATTAT CGCTTCTCCG GCGGTGGCTA

                hinPI
                hhaI/cfoI
                nlaIV
                narI
                kasi
                hinII/acyI
                hgiCI
                haeII     aciI
                bani      sfaNI
                bglI      ahaII/bsaHI
                AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GCGGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC
                GCGGAAGGG TTGTCAACGC ATCGGACTTA CCGCTTACCG CGGACTACGC CATAAAGAG GAATGCGTAG

```

FIG.320

FIG. 32P

```

                                mnlI
                                nlaIV
                                hgiCI
                                banI   taqI
                                hphI
2371 TCCCTTTAGG GTTCCGATT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTGG
    AGGGAATCC CAAGGCTAAA TCACGAAATG CCGTGGAGCT GGGGTTTTT GAACTAAACC

                                nlaIV
                                maeII   haeIII/palI
                                draIII   sau96I
                                bsaAI   asuI
2401 GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
    CACTACCAAG TGCATCACCC GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA

                                maeII   pleI
                                drdI   hinfI   maeII
                                bslI
                                bslI   avai
2501 CTTTAATAGT GGA CTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCTATCT CGGGCTATTC TTTTGATTTA
    GAAATTATCA CCTGAGAACA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG TTGGGATAGA GCCCGATAAG AAAACTAAAT

                                tru9I   pleI
                                mseI   hinfI
                                haeIII/palI   mseI
                                aluI   mseI   apoI
2571 TAAGGGATT TGGCGATTTC GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT
    ATCCCTAAA ACGGCTAAAG CCGGATAACC AATTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA

                                tru9I
                                mseI
                                tru9I
                                mseI
                                apoI
                                TTTTTTAAA

```

FIG.32Q

FIG. 32R

FIG. 32R

```

scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI      scrFI
nciI      nciI      nciI      nciI      nciI      nciI      nciI      nciI      nciI      nciI
mspI      mspI      mspI      mspI      mspI      mspI      mspI      mspI      mspI      mspI
hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII      hpaII
dsav      dsav      dsav      dsav      dsav      dsav      dsav      dsav      dsav      dsav
esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I      esp3I
bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI      bsmAI
bslI      cauII      aluI      nlaIII      mnlI      hphI      hphI      hphI      hphI      hphI
2831 ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGGAGG CAGTATTCTT
TGGCAGAGGC CCTCGACGTA CACAGTCTCC AAAAGTGGCA GTAGTGGCTT TGC GCGCTCC GTCATAAGAA

mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI      mnlI
haeIII/palI      haeIII/palI      haeIII/palI      haeIII/palI      haeIII/palI      haeIII/palI
sau96I      sau96I      sau96I      sau96I      sau96I      sau96I      sau96I      sau96I      sau96I
asul      asul      asul      asul      asul      asul      asul      asul      asul
bbsI      ecoO109I/draII      ecoO109I/draII      ecoO109I/draII      ecoO109I/draII      ecoO109I/draII
2901 GAAGACGAAA GGCCTCGTG ATACGCCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG
CTTCTGCTTT CCCGGAGCAC TATGCGGATA AAAATATCCA ATTACAGTAC

nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII      nlaIII
tru9I      rcAI      rcAI      rcAI      rcAI      rcAI      rcAI      rcAI      rcAI
mseI      bspHI      bspHI      bspHI      bspHI      bspHI      bspHI      bspHI      bspHI

hinII/acyI      hinII/acyI      hinII/acyI      hinII/acyI      hinII/acyI      hinII/acyI
ahaII/bsaHI      ahaII/bsaHI      ahaII/bsaHI      ahaII/bsaHI      ahaII/bsaHI      ahaII/bsaHI
aatII      aatII      aatII      aatII      aatII      aatII      aatII      aatII      aatII
ddeI      maeII      maeII      maeII      maeII      maeII      maeII      maeII      maeII

aciI      aciI      aciI      aciI      aciI      aciI      aciI      aciI      aciI
thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai
fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI
bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI
bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I
hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI
hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI
thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai      thai
fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI      fnuDII/mvnI
bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI      bstUI
bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I      bsh1236I
hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI      hinPI
hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI      hhaI/cfoI
2951 ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG
TATTATTACC AAAGAATCTG CAGTCCACCG TGAAAAGCCC CTTTACACGC

```

FIG.32S

```

nlaIV
3001 CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCCTGA
GCCTTGGGA TAAACAAATA AAAAGATTTA TGTAAGTTTA TACATAGCGG AGTACTCTGT TATTGGGACT

bsmAI
rcaI
bsrBI nlaIII
aciI bspHI
3071 TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGC CTTATTCCT
ATTACGAAG TTATTATAAC TTTTTCCTTC TCATACTCAT AAGTTGTAAA GGCACAGCGG GAATAAGGGA

mboII
earI/ksp632I
sspi
3141 TTTTTCGGC ATTTGCTT CCTGTTTTC CTACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAG
AAAAACGCCG TAAACGGAA GGACAAAAC GAGTGGTCT TTGCGACCAC TTTCATTTTC

fnu4HI
aciI
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT

hgiAI/aspHI
bsp1286
sau3AI bsiHKAI
mboI/ndeII(dam-)
dpnI(dam+) bmyI
dpnII(dam-)
mboII(dam-) apaLI/snoI
eco57I alw44I/snoI
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT

hphI sfaNI
hphI
sau3AI
mboI/ndeII(dam-)
dpnI(dam+)
dpnII(dam-)
bstYI/xhoII
alwI(dam-) aciI
bsrI nspBII
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT

```

FIG.32T

FIG. 32U

FIG. 32V

hinPI mspI
 hhaI/cfoI hpaII
 mstI scrFI
 aviII/fspI aluI nciI
 maeII rmaI dsav
 psp1406I maeI caulI
 3651 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AACTATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC
 GTTACCGTTG TTGCAACGCG TTTGATAATT GACCGCTTGA TGAATGAGAT CGAAGGGCCG
 tru9I foki
 mseI bsrI aciI
 aseI/asnI/vspI mnlI
 3711 AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG
 TTGTTAATTA TCTGACCTAC CTCCGCCCTAT TTCAACGTCC TGGTGAAGAC GCGAGCCGGG AAGCCCGACC
 bglI
 sau96I
 haeIII/palI
 hinPI asuI mspI
 hhaI/cfoI hpaII
 3781 CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC
 GACCAAATAA CGACTATTTA GACCTCGGCC ACTCGCACCC AGAGCGCCAT AGTAACGTCC
 mspI
 hpaII
 cfr10I
 nlaIV hphI
 gsuI/bpmI
 bsmAI aciI
 bsaI bsh1236I
 fnu4HI
 bbvI
 fnuDII/mvnI
 bstUI

FIG.32W

FIG.32X

```

sau96I
asuI
nlaIV
bsrI haeIII/palI mnII
3841 ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC
TGACCCCGGT CTACCATTCG GGAGGGCATA GCATCAATAG ATGTGCTGCC CCTCAGTCCG
pleI
hinFI
eam1105I

ddei
sau3AI nlaIV
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] hgiCI tru9I
dpnII[dam-] bani mnII msei
fokI
3901 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTCG
TTGATACCTA CTTGCTTTAT CTGTCTAGCG ACTCTATCCA CGGAGTGACT AATTCGTAAC
tru9I
msei
ahaIII/draI msei
maeIII
3961 GTAACGTGCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCATTTTAA
CATTGACAGT CTGGTTCAAA TGAGTATATA TGAATCTAA CTAATTTTG AAGTAAAAAT
tru9I
msei
nlaIII
rcaI
bspHI
maeII
tru9I
msei
4021 ATTTAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCCTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
TAAATTTTCC TAGATCCACT TCTAGGAAAA ACTATTAGAG TACTGGTTT AGGGAATTGC ACTCAAAAGC

```

FIG.32Y

```

sau3AI
mboI/ndeII[dam-]
dpnI[dam+] sau3AI
dpnII[dam-] mboI/ndeII[dam-]
bstYI/xhoII dpnI[dam+]
sau3AI alwI[dam-] dpnII[dam-]
mboI/ndeII[dam-] alwI[dam-]
dpnI[dam+] mboII[dam-]
dpnII[dam-] bstYI/xhoII
4091 TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTT
AAGGTGACTC GCAGTCTGGG GCATCTTTC TAGTTTCCTA GAAGAACTCT AGGAAAAAAA
          hgaI
          ddeI
          fnuDII/mvnI
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI fnu4HI
          hhaI/cfoI bbvI
4151 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTGTTG
GACGCGCATT AGACGACGAA CGTTTGTGCG ATGGTCGCCA CCAAACAAAC
          sau3AI
          mboI/ndeII[dam-]
          dpnI[dam+]
          dpnII[dam-]
          alwI[dam-]
          mspI
          hpaII aluI
4211 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGTAACTG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG
GGCCTAGTTC TCGATGGTTG AGAAAAAGGC TTCCATTGAC CGAAGTCGTC TCGCGTCTAT GGTTTATGAC
          bsrI
          maeIII eco57I hhaI/cfoI hinPI

```

FIG. 32Z-1

scrFI
 mvaI
 ecorII mvaI
 dsav ecorII
 bstNI
 bsaJI
 hinPI mnlI
 hhaI/cfoI aluI apyI[dcm+]

4561 GCGGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGAAAC
 CCGCCTGTCC ATAGGCCATT CGCCGTCCCA GCCTTGTCT CTGCGGTGCT CCCTCGAAGG TCCCCCTTTG

scrFI

dsav
 bstNI
 apyI[dcm+]

4631 GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTGG TGATGCTCGT
 CGGACCATAG AAATATCAGG ACAGCCCCAA GCGGTGGAGA CTGAACTCGC AGCTAAAAAC ACTACGAGCA

taqI

sfaNI

haeIII/palI

fnu4HI

aciI

thaI bslI

fnuDII/mvnI

bstUI

bsh1236I

nlaIV

aciI

4701 CAGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC
 GTCCCCCGC CTCGATACC TTTTGTGCGT CGTTGCGCGC

FIG.32Z-2

```

      haeIII/palI
scrFI
mvaI bsII
ecorII
dsav
bstNI
      nlaIV haeI
      nlaIII nspI
      haeIII/palI nspHI
      haeI aflIII
4741 CTTTATTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT
      GAAAAATGCC AAGGACCGGA AAACGACCGG AAAACGAGTG TACAAGAAAG GACGCAATAG GGGACTAAGA
      tfiI
      hinfI

      fnu4HI
      bbvI
      bsrBI aciI mcrI
      aluI aciI fnu4HI
4811 GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCCGCAG CCGAACGACC
      CACCTATTGG CATAATGGCG GAAACTCACT CGACTATGGC GAGCGGCGTC GGCTTGCTGG

      hinPI
      fnu4HI
      bbvI pleI
      hinPI hinfI
      hhaI/cfoI
4871 GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCCTCTC
      CTCGCGTCGC TCAGTCACTC GTCCTTCGC CTTCTCGCGG GTTATGCGTT TGGCGGAGAG
      mnlI
      aciI

```

FIG.32Z-3


```

    thal
    fnuDII/mvnl
    bstUI
    bsh1236I
    hinPI
    hhal/cfoI
    thal
    fnuDII/mvnl
    bstUI
    bsh1236I haeIII/palI      tru9I aluI
    bslI  eaeI  tfilI aseI/asnI/vspI      pvuII
    aciI  cfrI  hinfI  mseI  nspBII
4931 CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATCCAGC TGGCACGACA GGTTCCCCGA CTGGAAAGCG      bsrI  aciI
    GGGCGCGCAA CCGGCTAAGT AATTAGGTCTG ACCGTGCTGT CCAAAGGGCT GACCTTTCGC
                                     scrFI
                                     mvai
                                     ecorII
                                     dsav
                                     nlaIV bstNI
                                     hgiCI apyI[dcm+]
                                     bani bsaJI
                                     maeIII
                                     mnlI
    hinPI
    hhal/cfoI aseI/asnI/vspI
4991 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC
    CCGTCACTCG CGTTGCGTTA ATTACACTCA ATGGAGTGAG TAATCCGTGG GTCCCGAAAT GTGAAATACG

```

FIG.32Z-4

```

mspI      aciI      aluI      nlaIII
hpaII     bsrBI
5061 TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTCACACA GGAACAGCT ATGACCATGA
      AAGCCGAGC ATACAACACA CCTTAACACT CGCCTATTGT TAAAGTGTGT CCTTGTCCGA TACTGGTACT

```

```

tru9I
mseI
aseI/asnI/vspI
xmnI
asp700
5131 TTACGAATTA A
      AATGCTTAAT T

```

FIG.32Z-5

> Ilgis: 5141

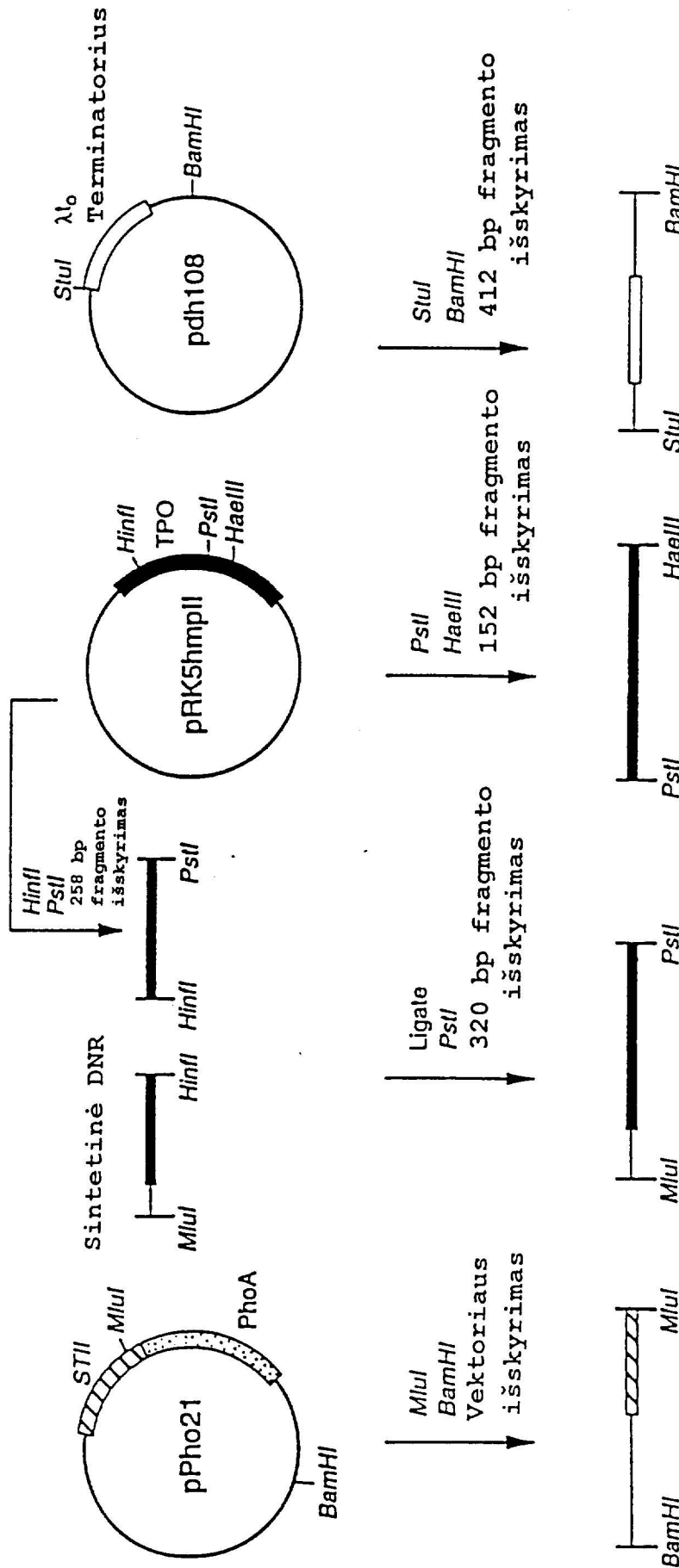


FIG.33A

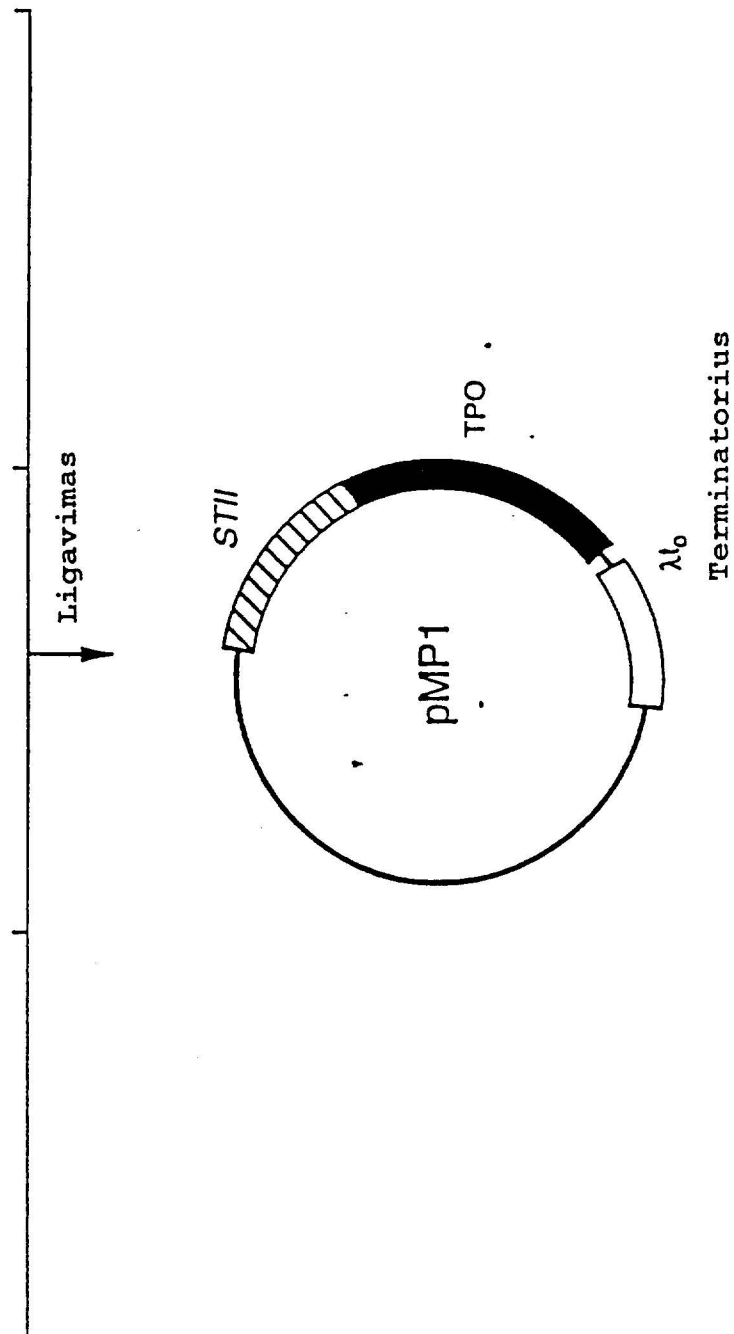


FIG. 33B

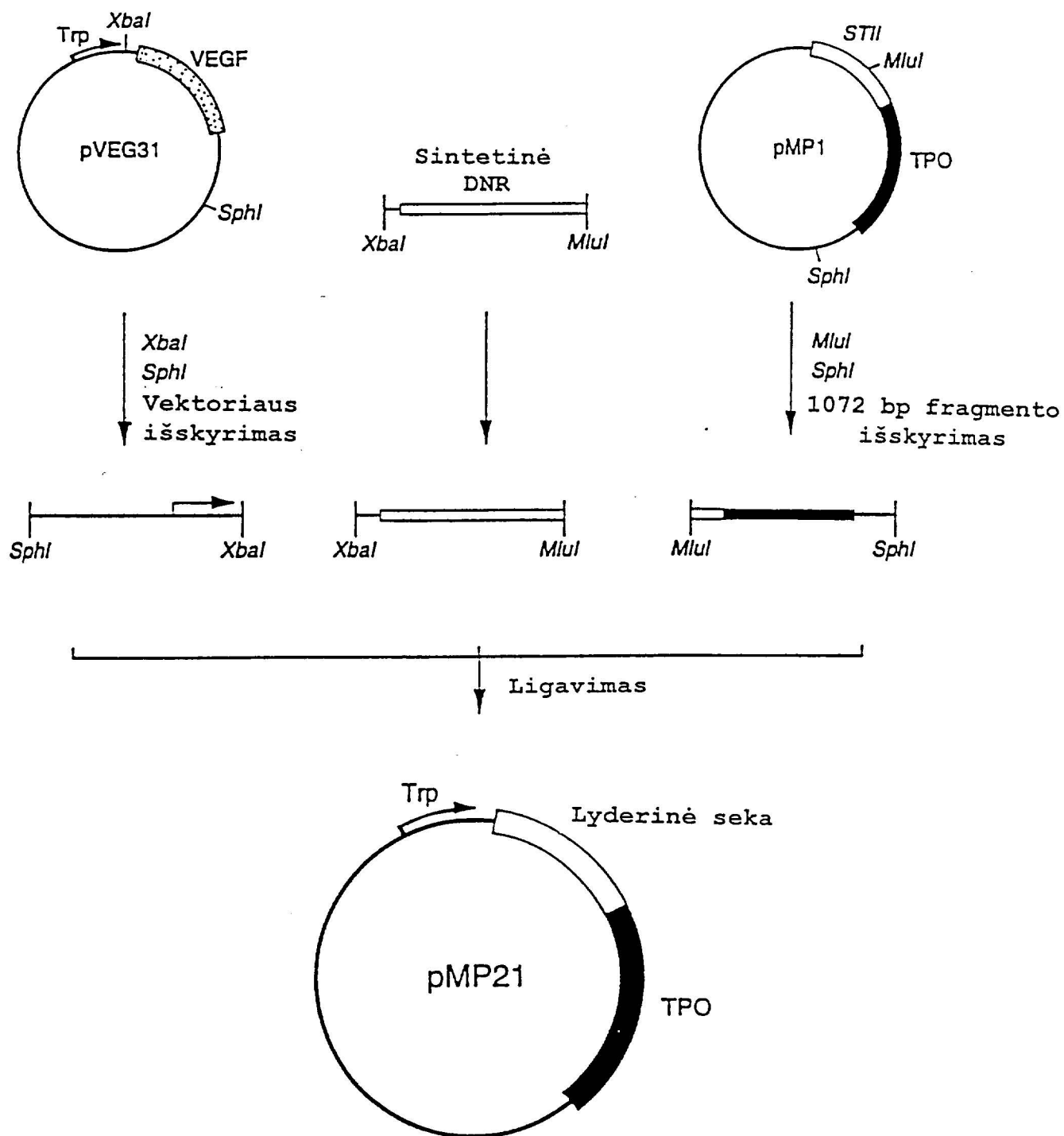


FIG.34

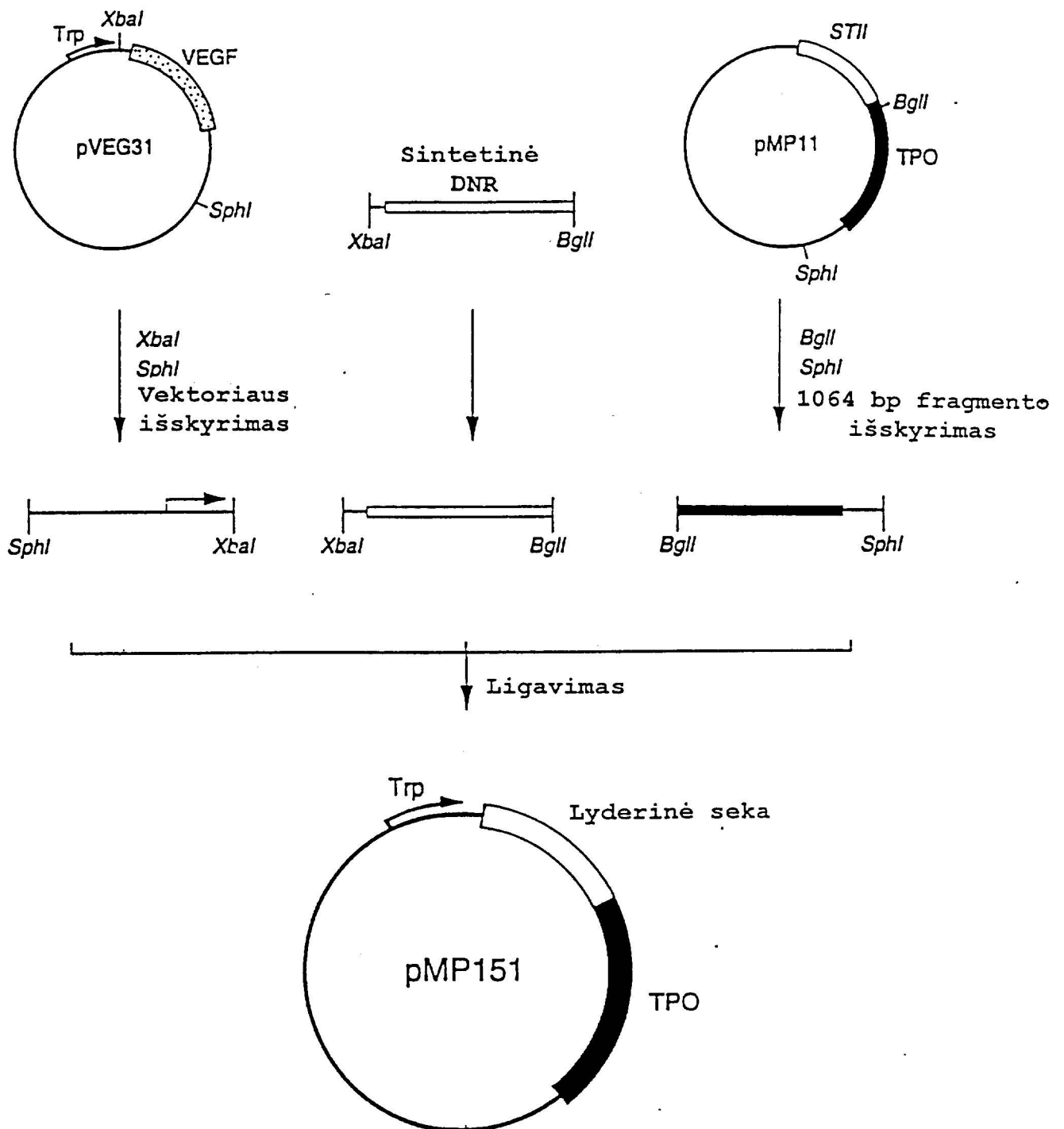


FIG.35

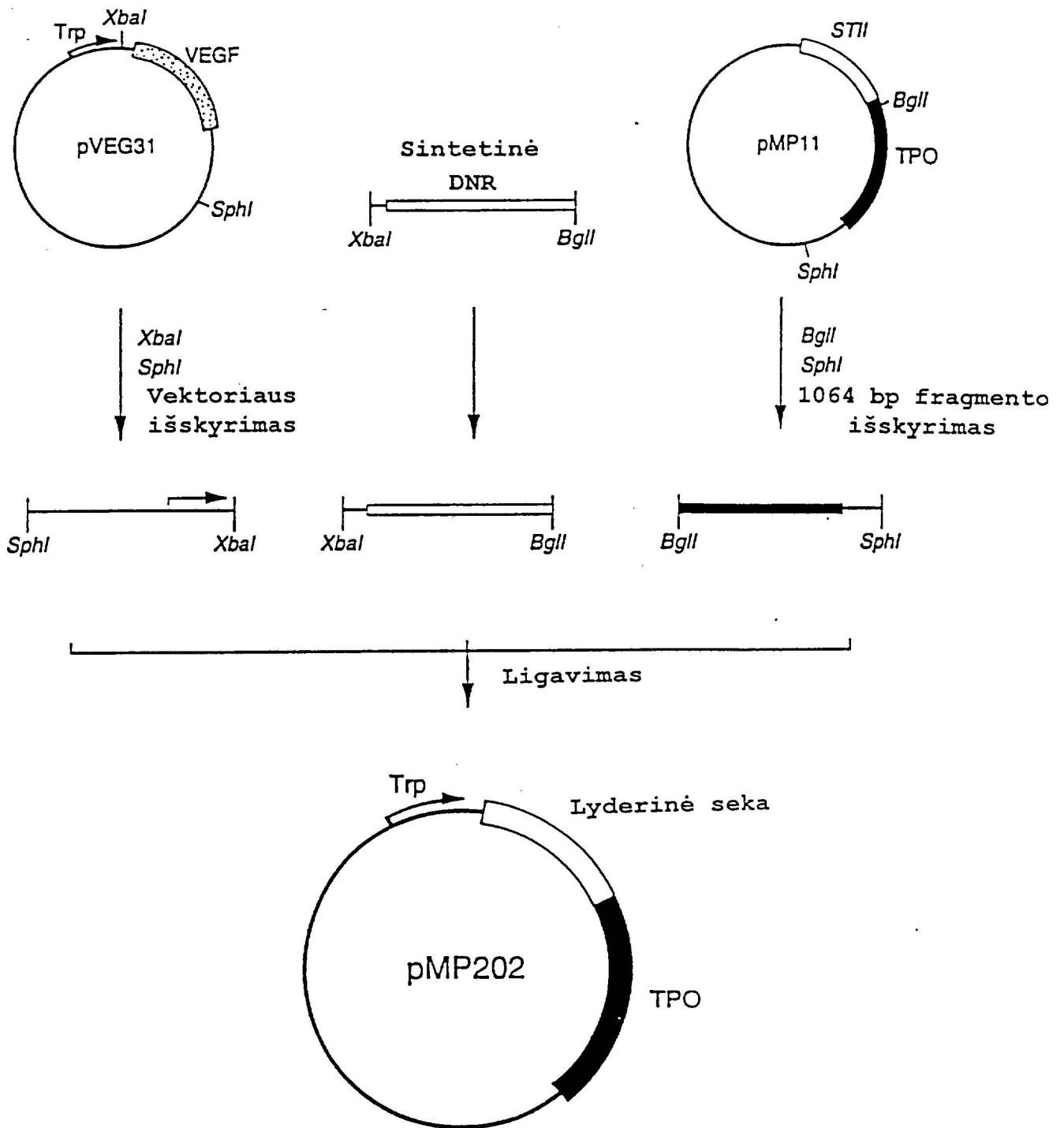


FIG.36

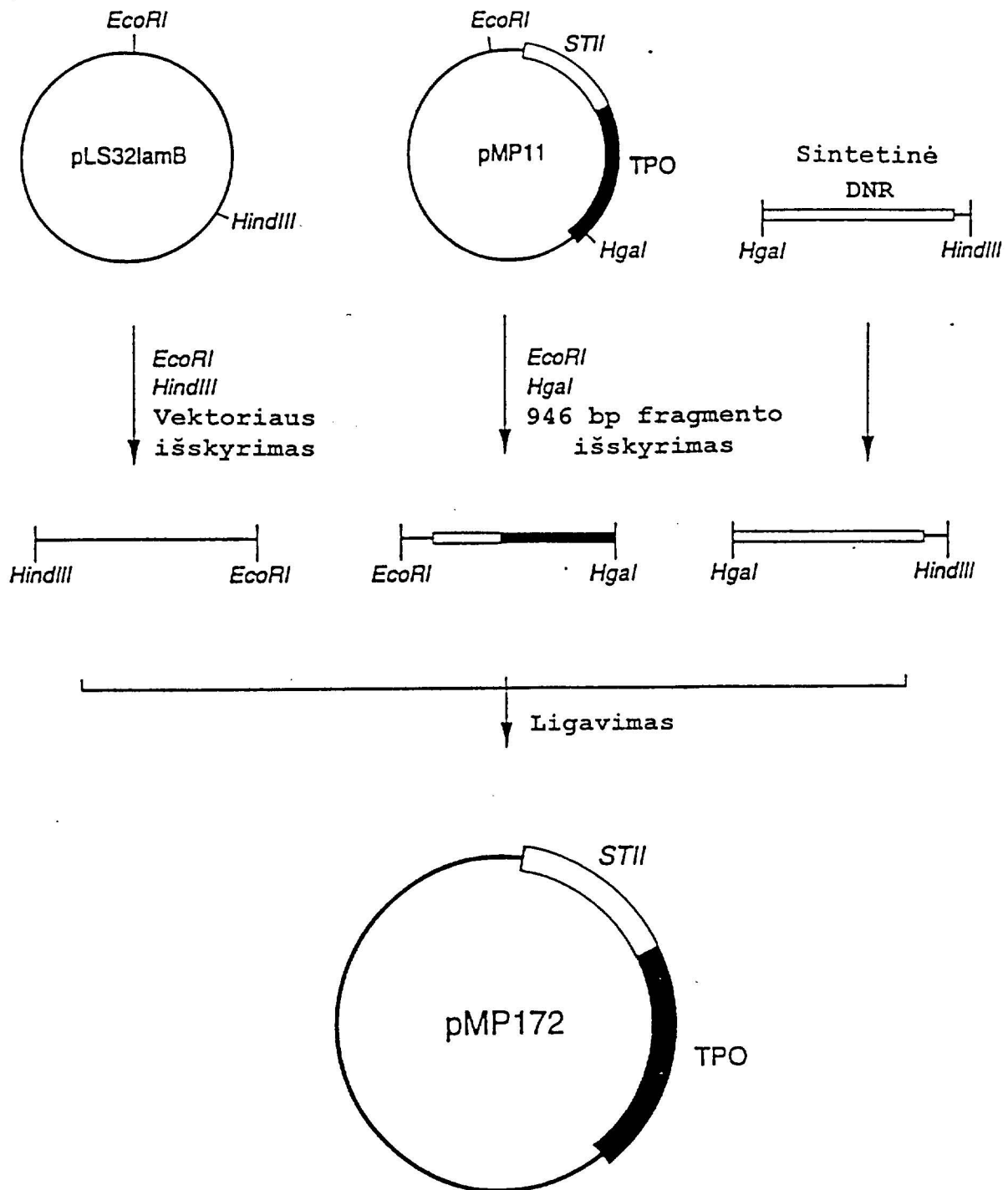


FIG.37

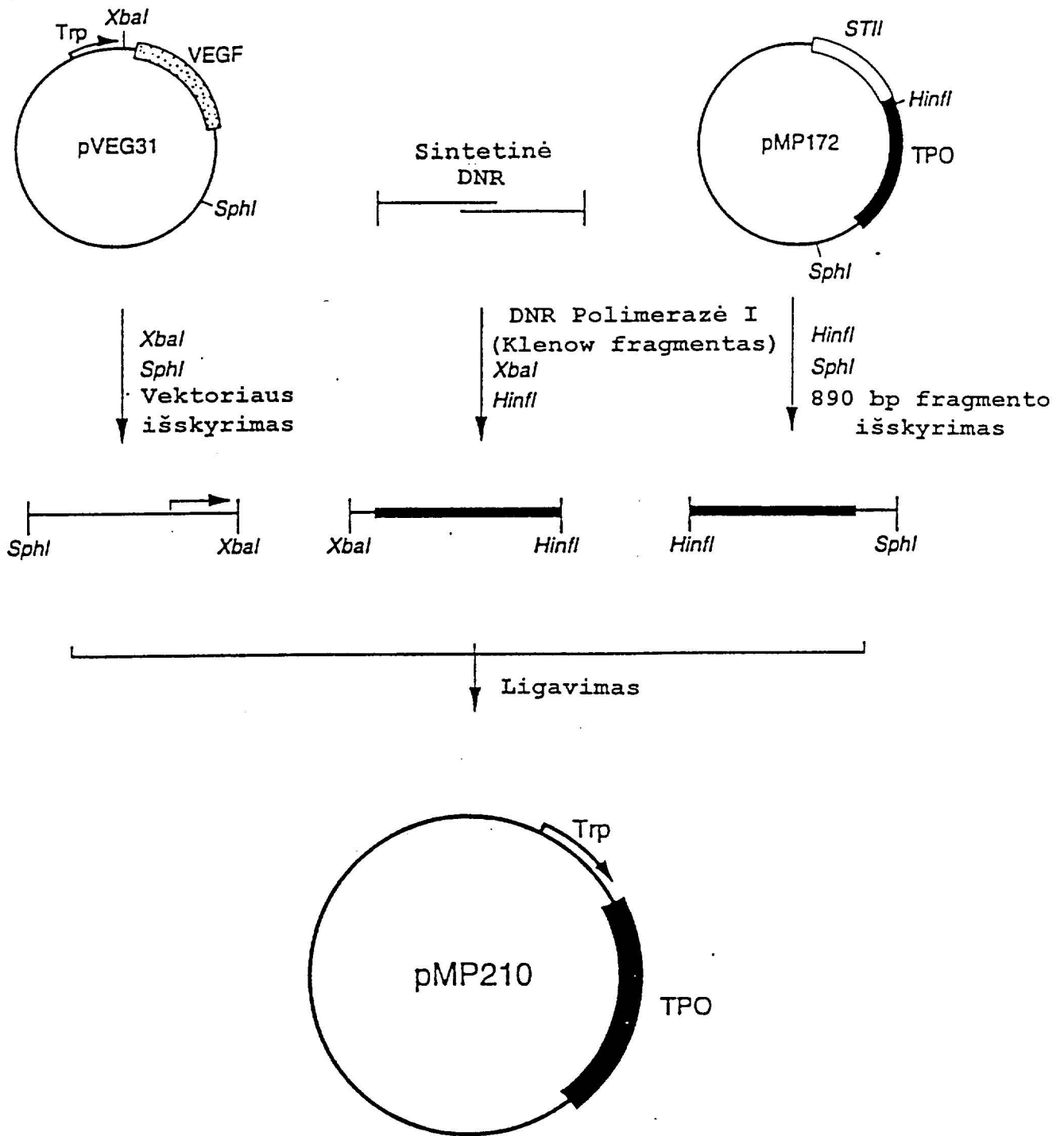


FIG.38

	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala
MP210 Bank	ATG	TCN	CCN	GCN	CCN	CCN	GCN
MP210-1	ATG	TCT	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG
MP210-T8	ATG	TCG	CCT	GCT	CCA	CCT	GCT
MP210-21	ATG	TCG	CCA	GCG	CCA	CCA	GCC
MP210-24	ATG	TCC	CCA	GCC	CCA	CCC	GCA
MP210-25	ATG	TCG	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG

FIG.39

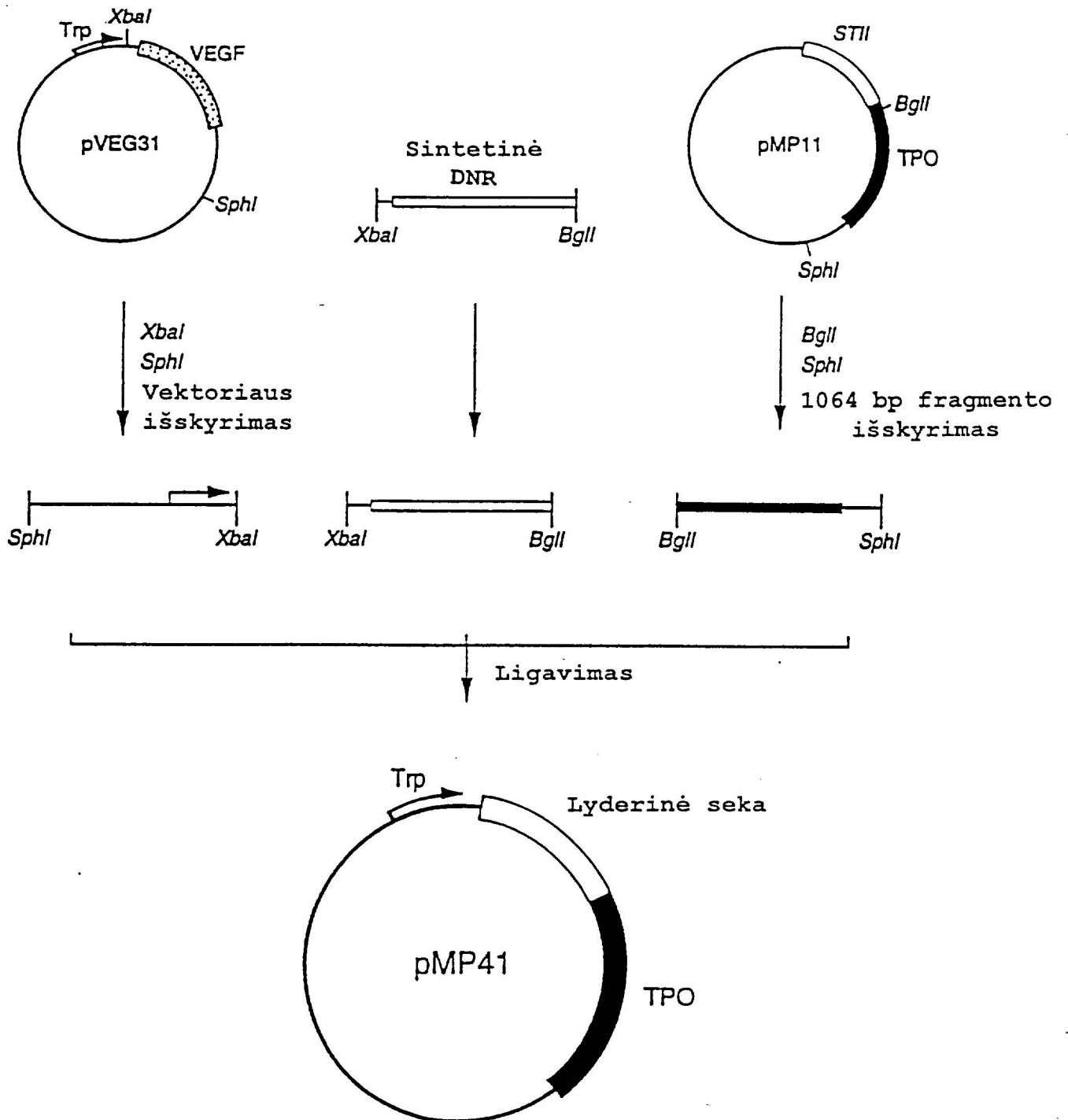


FIG.40

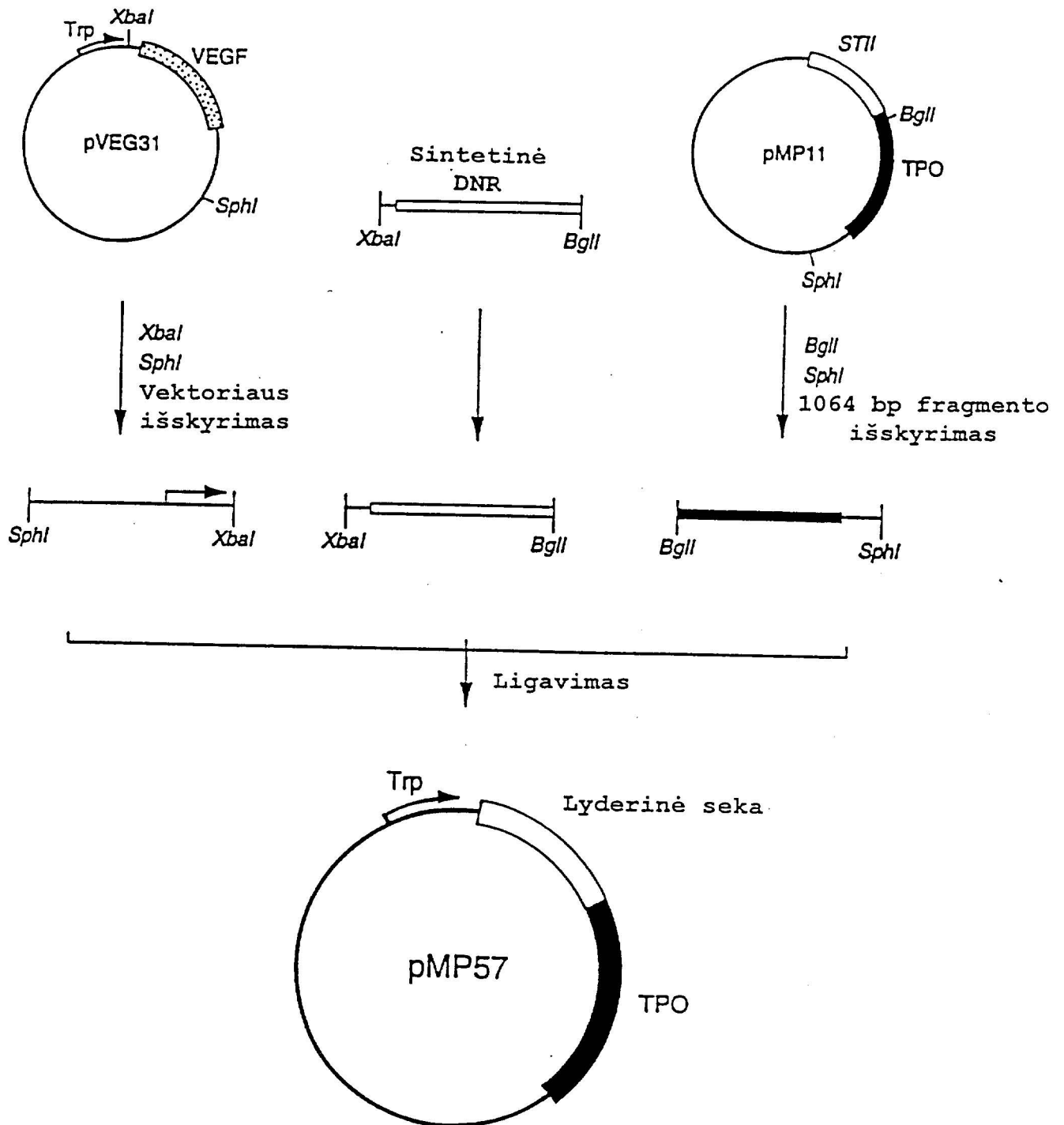


FIG.4 I

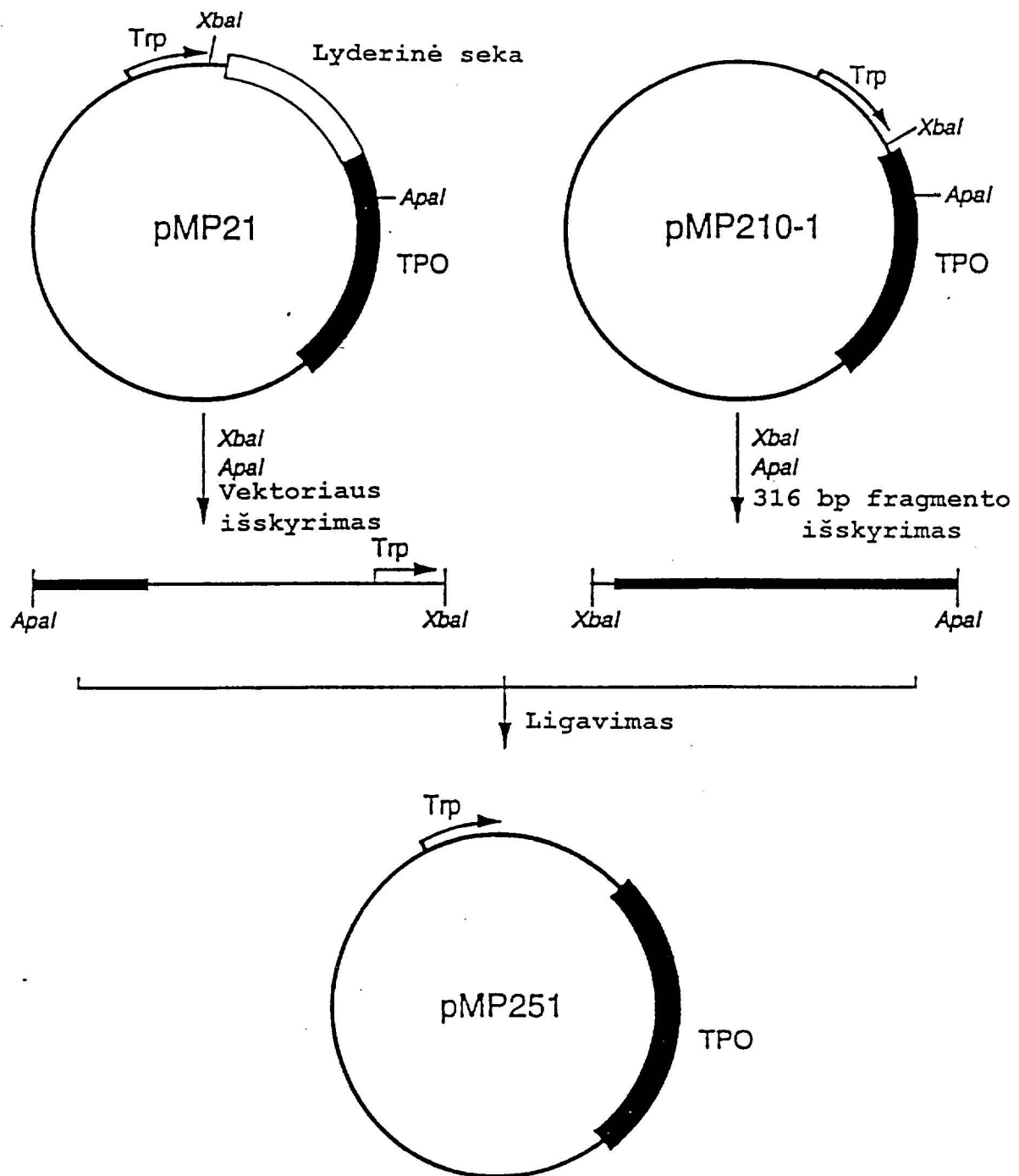


FIG.42