



(10) **LT 4877 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **4877**
- (21) Paraiškos numeris: **2001 055**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2001 05 22**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 10 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **2002 01 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP99/07238**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1999 09 30**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2001 05 22**
- (30) Prioritetas: **198 49 044.5, 1998 10 23, DE**
- (72) Išradėjas:
Heike PAHL, DE
- (73) Patent savininkas:
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG, Hugstetter Strasse 49, DE-79106
Freiburg, DE**
- (74) Patentinis patikėtinis:
**Marius JAKULIS JASON, A.A.A. Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2,
2001 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:
PRV-1 genas ir jo panaudojimas

- (57) Referatas:
Išradimas aprašo nukleotidų seką, kuri koduoja PRV-1 baltymą ir iš esmės susideda iš sekos ID Nr 1, taip pat šio geno nustatymo būdą ir šio geno koduojamą polipeptidą.

LT 4877 B

Išradimas susijęs su nukleotidų seka, koduojančia PRV-1 geną, su rekombinantine DNR, turinčia šią seką, su vektoriais, turinčiais rekombinantinę DNR ir su ląstelėmis, transformuotomis šiais vektoriais, taip pat su PRV-1 polipeptidu, su šio polipeptido antikūnais, su PRV-1 polipeptido nustatymo būdu ir su vaistais, turinčiais PRV-1 polipeptido arba antikūnų, nukreiptų prieš PRV-1 polipeptidą.

Polycythaemia rubra vera (eritemija), dar vadinama *polycythaemia vera* arba *p. vera* yra piktybinis hematologinis susirgimas, kuriam esant stebimas padidėjęs eritrocitinių, granulocitinių ir megakariocitinių ląstelių susidarymas. Liga yra kloninės kilmės ir kyla kraujodaros prekursoriaus mutacijos pasėkoje. Vokietijoje *p. vera* nustatoma 4-6 asmenims iš milijono gyventojų. Negydant, liga priveda prie mirties per 18 mėnesių. Gydomas kraujolaidos priemonėmis arba chemoterapija pratęsia vidutinę išgyvenimo trukmę iki daugiau nei 13 metų.

P. vera nustatoma pagal klinikinius požymius. Klinikinis vaizdas apima galvos skausmus, niežėjimą, splenomegaliją dviem trečdaliams pacientų, kraujavimą arba trombozes, hipertenziją trečdaliui pacientų, podagrą, kuri pasireiškia padidėjusiu šlapimo rūgšties kiekiu, ir kai kuriais atvejais sepsines opas. Svarbiausias laboratorinis kriterijus yra padidėję hemoglobino, hematokrito, eritrocitų kiekiai ir bendras eritrocitų kiekis, taip pat daugeliu atvejų neutrofilinė granulocitozė arba trombocitozė. Kadangi, iš vienos pusės, dauguma kriterijų yra gana neapibrėžti, ir, iš kitos pusės, ne visi pacientai atitinka šiuos kriterijus, dažnai būna sunku atskirti *p. vera* nuo kitų mieloproliferacinių susirgimų, tokių kaip chroninė granulocitinė leukemija arba esminė trombocitozė, ir patvirtinti diagnozę. Iki šiol visiškai nežinomos molekulinės *p. vera* priežastys. Kadangi *p. vera* eiga negydant būna labai sunki, svarbu tiksliai ją diagnozuoti.

Todėl išradimo tikslas yra surasti molekulines *polycythaemia rubra vera* priežastis ir sukurti diagnozės galimybes.

Šis tikslas pasiekiamas išskiriant geną, kuris ekspresuojamas specifiskai esant *p. vera*, bet ne sveikuose kontroliniuose individuose. Genas apibūdinamas kaip PRV-1 (*polycythaemia rubra vera*) genas.

Panaši nukleotidų seka atskleista tarptautinėje paraiškoje WO 98/50552.

Tokiu būdu, vienu aspektu išradimas susijęs su polinukleotidu, kuris koduoja PRV-1 geną ir iš esmės susideda iš sekos ID Nr. 1. Šio išradimo polinukleotidai gali būti viengrandės arba dvigrandės DNR arba RNR. Jei tai yra RNR, šios srities specialistui bus aišku, kad vietoj "T" nukleotidų yra "U" nukleotidai. "Polinukleotidas" suprantamas kaip nukleino rūgštis, turinti 15 arba daugiau nukleotidų.

Šio išradimo nukleotidų seka pavaizduota Fig. 1. Taigi, išradimas susijęs su polinukleotidu, kuris atitinka seką, parodytą Fig. 1, ir taip pat su polinukleotidu, kurio nukleotidų seka turi mažų skirtumų. Šioje paraiškoje maži skirtumai suprantami kaip reiškiantys sekas, kuriose keletas, geriausia ne daugiau kaip 50, ypač gerai ne daugiau kaip 25 nukleotidai gali būti pakeisti, tačiau geno, koduojamo nukleotidų sekos, funkcijai liekant nepakitusiai. Šios srities specialistui žinomas faktas, kad bazių tripletas, kuris koduoja aminorūgštį, gali būti pakeistas kitu tripletu, kuris koduoja tą pačią aminorūgštį. Be to, sritys, kurios yra mažiau svarbios, gali būti ištrintos ir/arba mutuotos mažu laipsniu. Konkretaus įgyvendinimo atveju polinukleotidas susideda iš sekos Nr. 1 nukleotidų nuo 36 iki 1346, kas yra PRV-1 geną koduojanti sritis. Kitas įgyvendinimas apima sekos Nr. 1 nukleotidus nuo 36 iki 1262. Ši sritis, galimas daiktas, koduoja PRV-1 polipeptido aktyvią sritį. Galiausiai, šio išradimo polinukleotidas taip pat gali apimti sekos Nr. 1 nukleotidus nuo 39 iki 1346 arba nuo 39 iki 1262 tokiu būdu, kad neliktų kodono, kuris koduoja pradinį metioniną. Geriausias įgyvendinimas yra polinukleotidas, kuris susideda iš sekos Nr. 1 nukleotidų 99-1346 arba 99-1262. Tai duoda, kad 5' gale nelieta kodono, kuris koduoja PRV-1 polipeptido signalinį peptidą.

Šio išradimo polipeptidas taip pat gali būti PRV-1 geno fragmentas. Kaip taisyklė, fragmentas turi daugiau nei 100 nukleotidų, tačiau geriau, jei daugiau nei 300 nukleotidų. Fragmentai taip pat gali būti naudojami kaip praimeriai arba kaip zondai, konkrečiai, PCR; šiuo atveju fragmentai gali būti sutrumpinti, kad geriau tiktų šiam tikslui. Paprastai praimeriai yra 10-30 nukleotidų ilgio, o zondai - 15-50 nukleotidų ilgio.

PRV-1 genas yra endogeninis genas, kurio ekspresija sveikuose individuose apsiriboja keliais organais. Normaliu atveju jis ekspresuojamas pagrindiniuose kraujodaros organuose, t.y., kaulų čiulpuose ir vaisiaus kepenyse, ir silpnai ekspresuojamas blužnyje, bet visai neekspresuojamas širdyje, raumenyse, kasoje ar

inkstuose. Pacientuose, sergančiuose *p. vera*, šis genas labai stipriai ekspresuojamas kraujodaros ląstelėse.

PRV-1 genas koduoja baltymą, kuris turi seką, parodytą Fig. 2. Signalinis peptidas, kuris būna visų paviršinių molekulių baltymų sekose ir normaliu atveju pašalinamas, kai baltymas apdorojamas, yra atskirtas brūkšneliu. Baltymas turi seką ID Nr. 2. Kitas išradimo aspektas todėl yra iš esmės grynas polipeptidas, turintis seką Nr. 2, arba polipeptidas, turintis seką Nr. 2, bet neturintis signalinio peptido (t.y., sekos Nr.2 22-437 aminorūgščių). Kiti įgyvendinimai apima sekos Nr.2 aminorūgštis 1-409 arba 22-409, kas tikriausiai yra baltymo aktyvi sritis.

Biologinio aktyvumo požiūriu geriau, kai šio išradimo polipeptidas yra glikozilintas; geriausia, kai jis yra N-glikozilintas. Jis gali būti glikozilintas mažiausiai prie vienos iš PRV-1 polipeptido aminorūgščių Asn-46, Asn-189 ir Asn-382 (aminorūgščių numeriai pagal seką Nr.2). Išradimas taip pat apima šio išradimo polipeptidų fragmentus, kurie yra N-glikozilinti. Fragmentai yra mažiausiai 50 aminorūgščių ilgio, geriau, mažiausiai 100 aminorūgščių ilgio ir geriausia, mažiausiai 150 aminorūgščių ilgio. Kitame įgyvendinime, polipeptidas gali būti O-glikozilintas.

Šios srities specialistui aišku, kad konkrečios aminorūgštys gali būti pakeistos kitomis aminorūgštimis, nepažeidžiant baltymo biologinio aktyvumo. Tokios šio išradimo polipeptidų modifikuotos formos taip pat yra išradimo dalis. Aminorūgščių pakeitimai yra tokie, kurie neturi neigiamos įtakos baltymo biologiniam aktyvumui. Šios srities specialistas, parinkdamas pakeitimus, gali naudotis gerai žinomomis taisyklėmis.

Priklausomai nuo gavimo būdo PRV-1 polipeptidas gali turėti, pavyzdžiui, glikozilfosfatidilinozitolio surišančią grupę. Pastaroji rišasi su aminorūgštimis, atitinkančiomis sekos ID Nr.2 407-409 aminorūgštis. Surišanti GPI grupė naudojama surišti baltymą per lipidus su išorine ląstelės membrana. Tačiau dėl priežasčių, kurios ligi šiol nėra galutinai aiškios, dažnai stebima, kad GPI grupę surišti baltymai taip pat išskiriami į terpę. Tai vadinama "nusimetimu". Iki šiol nėra išaiškinta, ar tai yra specifinis procesas, t.y., ar tokie baltymai atskeliami nuo membranos fermentų pagalba valdomame procese, ar tai yra nespecifinis surišančios grupės praradimas. Vadinasi, tikėtina, kad PRV-1 bus aptinkamas tiek ląstelės membranoje, tiek už ląstelės ribų.

Išskirta forma, kuri nesurišta su membrana, tikriausiai yra svarbesnė polipeptido kaip augimo faktoriaus veikimui, kadangi ši forma gali difunduoti ir pasiekti kitas ląsteles.

Šios srities specialistui aišku, kad įmanoma įtakoti baltymo prisirišimą prie membranos, manipuliuojant šiomis aminorūgštimis. Konkrečiai, tai susiję su apibrėžtos struktūros DNR pagaminimu, kurios numatytos PRV-1 polipeptido arba jo fragmentų ekspresijai. Kodonai, koduojantys šias aminorūgštis, gali būti mutuoti arba ištrinti.

Genas koduoja uPAR/Ly6 šeimos paviršiaus receptorių. Šio receptoriaus šeima gali perduoti mitogeninius signalus, t.y., signalus, stimuliuojančius ląstelės dalijimąsi. Todėl manoma, kad perteklinė PRV-1 geno ekspresija, tame tarpe sergančių *p. vera* granulocituose, prisideda prie šių ląstelių hiperproliferacijos.

Nustatyta, kad PRV-1 neekspresuojamas sveikų individų arba sergančių kitomis mieloproliferacinėmis ligomis, pavyzdžiui, chronine granulocitine leukoze, ūmia granulocitine leukoze arba esmine trombocitoze, individų granulocituose.

Siekiant panaudoti PRV-1 geno koduojamą polipeptidą analizės ir nustatymo metuose, jis tikslingai generuojamas rekombinantinės DNR pagalba, kai rekombinantinė DNR geriau turi nukleotidų seką ID Nr.1, arba bent PRV-1 geno koduojančią sritį, tai yra sekos ID Nr.1 nukleotidai 36-1346, bent jau nukleotidai 39-1262, operaciniai sujungti su promotoriumi. Tačiau rekombinantinė DNR taip pat gali turėti tik sekos Nr.1 fragmentą.

Išradimas dar susijęs su vektoriumi, turinčiu rekombinantinę DNR PRV-1 polipeptidui arba jos fragmentą, ir su ląstele-šeimininke, transfekuota arba transformuota šiuo vektoriumi. Ląstelė-šeimininkė gali būti prokariotinė, pavyzdžiui, bakterija, tokia kaip *E.coli*. Tačiau polipeptidai, kurie ekspresuojami, būna neglikozilinti. Todėl pirmenybė teikiama eukariotinėms ląstelėms-šeimininkėms, kurios gali glikozilinti ekspresuojamą baltymą po transliacijos ir modifikuoti jį kitais būdais. Eukariotinių ląstelių-šeimininkių pavyzdžiai yra vabzdžių ląstelės, tokios kaip Sf9, skirtos ekspresijai infekavus rekombinantiniais bakulovirusais, ir žinduolių ląstelės, tokios kaip COS, CHO ir HeLa ląstelės. Šie pavyzdžiai nėra išsamūs. Šios srities specialistui aišku, kad glikozilinimo pobūdis gali skirtis, priklausomai nuo ląstelės-šeimininkės. Ekspresijos produktų biologinis aktyvumas taip pat gali skirtis. Ypatingai pirmenybė teikiama ląstelėms-šeimininkėms, kurios produktą glikozilina ir ekspresuoja tokiu būdu, kad išliktų baltymo biologinis aktyvumas.

PRV-1 polipeptidas, kuris išskiriamas iš granulocitų arba gaunamas rekombinantiniu būdu, gali būti naudojamas tiek *polycythaemia vera* diagnostikai, tiek jos gydymui.

Viena terapinė galimybė yra "antiprasmė terapija". Šis metodas naudoja "antiprasmę" RNR molekulę, tai yra RNR, kuri yra komplementari PRV RNR. Kadangi PRV-1 RNR savo pradžioje turi seką 5'-AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCC-3' (SEKA ID Nr.3), priešprasmė RNR, nukreipta prieš šią seką, turėtų tokią nukleotidų seką: 5'-GGCTGGTAATCTCTTTCTGCTTTT-3' (seka ID Nr.4). Ši antiprasmė RNR įtraukiama į vektorių ir įvedama į *p. vera* ląsteles. Ši RNR įvedama, pavyzdžiui, transfekavimo būdu, kai transfekavimui naudojamas vektorius yra taip konfigūruotas, kad ji įvedama specifiškai į *p. vera* ląsteles. Priešprasmės RNR ekspresija sąlygoja, kad tampa neįmanoma transliacija nuo iRNR. Ląstelės, paveiktos tokiu būdu, toliau negamina PRV-1 baltymo.

Todėl išradimas taip pat yra susijęs su *p. vera* nustatymo būdu, kuris charakterizuojamas tuo, kad nustatomas PRV-1 polipeptidas arba jo epitopas ir įvertinamas ekspresijos mastas.

Šio receptoriaus perteklinė ekspresija subrendusiose ląstelėse, esančiose ne kaulų čiulpuose, pavyzdžiui, granulocituose, yra svarbi *p. vera* ligos indikacija. Ši perteklinė ekspresija tikslingai nustatoma imuninės analizės būdu, naudojant antikūnus, kurie nukreipti prieš PRV-1 receptorių. Tinkami tyrimo metodai yra žinomi imuninės analizės variantai, kuriuose naudojami PRV-1 polipeptidui specifiniai antikūnai kartu su kitais žymėtais antikūnais, kurie gali būti imobilizuoti arba egzistuoti tirpale. Žymėjimas gali būti atliktas *per se* žinomais būdais, pavyzdžiui, naudojant radioaktyvius izotopus, fluorescencijos arba liuminescencijos priemonėmis, naudojant fermentus, spalvą duodančias reakcijas arba naudojant kitas nustatymui tinkančias grupes. Šie variantai yra žinomi šios srities specialistui ir čia nereikalauja detalesnių paaiškinimų. Pagal šį išradimą ypač teikiama pirmenybė ELISA metodikai.

Antikūnai, reikalingi specifiniam PRV-1 receptoriaus nustatymui, panašiai gali būti gaunami *per se* žinomais būdais. Tinka tiek monokloniniai, tiek polikloniniai antikūnai, teikiant pirmenybę monokloniniams antikūnams.

Antikūnų gamybai taip pat gali būti panaudoti peptidai, kilę iš baltymo. Šio išradimo kontekste sėkmingai buvo panaudoti peptidai, turintys sekas:

a) KVSDLPRQWTPKN (aminorūgštys 34-46) [seka ID Nr.5], ir

b) SAREKRDVQPPASQH (aminorūgštys 391-405) [seka ID Nr. 6].

Polikloniniai antikūnai paprastai gaminami imunizuojant PRV-1 polipeptidu tinkamą šeimininką (triušį), jei reikia, surišant su imunologiniu nešikliu (adjuvantu), ir įvertinamas imuninis atsakas. Monokloniniai antikūnai gali būti gaminami *per se* žinomu būdu, naudojant hibridomų metodiką. Antikūnai gali būti išgryninami afininiu būdu. Antikūnų gamyba ir išgryninimas aprašyti, pavyzdžiui, "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Lane, Cold Spring Harbor laboratory Press.

Be to, tokie prieš PRV-1 nukreipti polikloniniai arba monokloniniai antikūnai gali būti naudojami ligos gydymui.

Kitame išradimo įgyvendinime PRV-1 receptorių gali būti nustatomas naudojant atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandinės sintezės (RT-PCR) metodiką. Tam pirmiausia iš PRV-1 perteklingai ekspresuojančios ląstelės, kuri kaip taisyklė yra granulocitas, išskiriama RNR. Tada *per se* žinomu būdu įvykdoma atvirkštinė transkripcija (RT), naudojant RT praimerį. RT praimeris, geriausia, yra toks, kuris turi tokią nukleotidų seką (seka ID Nr. 7):

ATTAGGTTATGAGGTCAGAGGGAGGTT .

Šiuo būdu specifinė PRV-1 RNR transformuojama į DNR. Po to ši DNR pagausinama PCR reakcijos metu *per se* žinomu būdu. Amplifikacijos cikluose geriausia naudojami šie du praimeriai:

Kaip prasminis praimeris (seka ID Nr. 8):

GCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGG .

Kaip antiprasminis praimeris (seka ID Nr. 9):

GAATCGTGGGGGTAATAGAGTTAGCAGG .

Šios srities specialistas lengvai sugebės panaudoti atskleistas sekas kitų tinkamų praimerių suradimui.

Kadangi šioje metodikoje pradine medžiaga panaudota RNR, PCR signalas yra vien teigiamas, kai taip pat ekspresuojamas PRV-1. Kaip paaiškinta aukščiau, taip būna

tik tais atvejais, kai pacientas serga *p. vera*. Sveikų pacientų granulocituose PRV neekspresuojamas. Reiškia, RT-PCR signalo nebuvimas reiškia, kad *p. vera* nėra.

Kitu alternatyviu atveju *p. vera* diagnozei taip pat galima naudoti blotingo metodą, geriausia Northern Blot. Šioje metodikoje RNR išskiriama iš granulocitų ir po to tirinama PRV-1 ekspresijos požimiui, naudojant blotingo metodiką, pavyzdžiui, Northern Blot. Sekos ID Nr. 1 kDNR, arba sekos fragmentas, gali būti vartojamas zondų. Hibridizacija įvyksta tik tuo atveju, jei granulocitai būna paimti iš sergančio *p. vera* paciento, kadangi tik tada vyksta ekspresija granulocituose. Hibridizacijos nebuvimas rodo, kad individas, kurio granulocitai tiriami, neturi *p. vera*.

Northern blot hibridizacijai taip pat galima naudoti geno fragmentą. Toks fragmentas paprastai būna daugiau nei 100 bazių ilgumo, geriau, daugiau nei 300 bazių ilgumo. Alternatyviai, įvairūs skirtingi geno fragmentai, kurie gali būti naudojami zondais Northern blot'e, gali būti gaunami skaldant geną endonukleazėmis. Jei fragmentai yra kilę iš kDNR, tada jų molekulės yra dvigrandės, kurias hibridizacijai reikia išskirstyti į pavienes grandines. Tinkami pavyzdžiai yra Bam HI-PstI fragmentas nuo 420 bazių poros iki 831 bazių poros, arba PstI-PstI fragmentas nuo 831 bazių poros iki 1900 bazių poros.

PRV-1 iRNR, ir tuo pačiu PRV-1 ekspresija taip pat gali būti nustatyta pirmiausia atvirkščiai transkribuojant iRNR RT-PCR reakcijoje ir po to pagausinant kDNR; pagausinta DNR po to nustatoma hibridizuojant su zondų.

Teigiamos diagnozės atveju ligą reikia gydyti, kadangi kitu atveju ji priveda prie mirties per gana trumpą laiką. Šiam gydymui galima naudoti specifinius antikūnus, nukreiptus prieš PRV-1, ir su kuriais gali susiristi citotoksiniai komponentai.

Todėl išradimas dar susijęs su vaistu, kuris susideda iš antikūnų, nukreiptų prieš PRV-1 receptorių, kartu su įprastiniais priedais.

Kadangi *p. vera* atveju PRV-1 receptorių ekspresuojamas perteklingai, dauguma antikūnų yra surišti su paveiktų granulocitų paviršiumi, kai jie kontaktuoja su anti-PRV-1 antikūnais. Daugumos antikūnų susirišimas su šiomis ląstelėmis stimuliuoja imunologines ląsteles suardyti šiuos granulocitus. Tokiu būdu, įmanoma specifiškai eliminuoti *p. vera* ląsteles.

Stebėtina, tačiau nustatyta, kad PRV-1 polipeptidas rodo hematopoetinį aktyvumą. PRV-1 polipeptidas gali stimuliuoti kai kurias hematopoetinio prekursoriaus

ląsteles, kad susidarytų eritroidų kolonijos. Šią funkciją ypač rodo N-glikozilinti PRV-1 polipeptidai. Tokiu būdu, šio išradimo polipeptidai, kuriems teikiama pirmenybė, yra N-glikozilinti PRV-1 polipeptidai ir jų fragmentai, kurie demonstruoja augimo faktoriaus aktyvumą.

Todėl dar vienas išradimo aspektas yra vaistas, kuris, be farmaciškai toleruojamo užpildo, susideda iš PRV-1 polipeptido arba jo biologiškai aktyvaus fragmento. Geriau, kai PRV-1 polipeptidas yra glikozilintas PRV-1 polipeptidas, dar geriau, N-glikozilintas PRV-1 polipeptidas arba jo biologiškai aktyvus fragmentas. Išradimas taip pat susijęs su vaistais, kurie susideda iš bent vieno polinukleotido pagal šį išradimą.

Šis išradimas dar susijęs su PRV-1 polipeptido arba jo biologiškai aktyvaus fragmento panaudojimu augimo faktoriumi *in vivo* ir *ex vivo*. PRV-1 polipeptidas arba jo biologiškai aktyvus fragmentas gali būti naudojamas kaulų čiulpų ir apytakos visų pancitopenijų ir pancitopatijų gydymui (periferinio kraujo ir kaulų čiulpų ląstelių sudedamųjų dalių keitimas). Šio išradimo polipeptidai gali, pavyzdžiui, būti naudojami gydant anemiją, esant inkstų nepakankamumui, chemoterapijai arba švitinant visą kūną, gydant neutropeniją ir trombocitopeniją, esant chemoterapijai arba viso kūno švitinimui, gali būti naudojami periferinių arba kaulų čiulpų kamieninių ląstelių *ex-vivo* apdorojimui, siekiant pagausinti ir perpilti pacientui, sepsio, sisteminio uždegiminio atsako sindromo (SIRS) arba regioninių uždegiminių reakcijų gydymui. Šio išradimo polipeptidai arba juos turintys vaistai gali būti įvedami daugybe būdų. Įvedimo formos apima intraveninį, subkutaninį, intraperitoninį, peroralinį, transderminį įvedimą, įvedimą į raumenis ir per gleivinę.

Šio išradimo polinukleotidai taip pat gali būti naudojami pancitopenijų ir pancitopatijų gydymui. Šiuo atveju tikslas yra ekspresuoti PRV-1 polipeptidą arba jo funkcionalų fragmentą pažeisto paciento ląstelėse. Ryšium su tuo genų terapijos metodų naudojimas yra pirmiausias ir svarbiausias. Ląstelės gali būti išskirtos iš paciento ir transfektuotos šio išradimo polinukleotidu (*ex-vivo* manipuliacija), o po to jos gražinamos į paciento organizmą. Įmanoma taip pat įsivaizduoti metodiką, pagal kurią šio išradimo polinukleotidai patektų į tikslines ląsteles virusinio pernešimo būdu. Įterptų nukleino rūgščių ekspresija duotų hematopoetinį aktyvumą.

Išradimas taip pat susijęs su rinkiniais arba *polycythaemia vera* arba hematopoetinės sistemos sutrikimų nustatymui. Šie rinkiniai susideda iš šio išradimo

polinukleotido ir/arba šio išradimo polipeptido ir/arba vieno ar daugiau šio išradimo antikūnų. Be to, į rinkinių sudėtį gali įeiti konteineris arba kompozicijos, tinkamos nustatymo reakcijų įgyvendinimui. Tokių kompozicijų pavyzdžiai yra buferiniai tirpalai, blokuojančių membranų reagentai, hibridizacijos tirpalai, antriniai antikūnai, nustatymo reakcijų substrato tirpalai, ir t.t. geriausia, kai rinkinys naudojamas PCR reakcijų, Northern bloto, Southern bloto, Western bloto, ELISA, RIA ar panašių metodikų realizavimui.

Toliau pateikiami pavyzdžiai, paaiškinantys išradimą.

1 pavyzdys

PRV geno charakterizavimas

Siekiant charakterizuoti geną, atlikti tokie eksperimentai:

- granulocitų išskyrimui iš saugomo kraujo arba kraujo, surinkto kraujuojant *p. vera* pacientams, naudojamas toks protokolas:
- prie kraujo pridedamas toks pat tūris 3 % dekstrano tirpalo 0,9 % NaCl, ir mišinys paliekamas 20 minučių kambario temperatūroje (RT).
- Mišinys išsiskirsto į dvi fazes. Viršutinė šviesesnė fazė atskiriama ir 10 minučių centrifuguojama esant 1800 g ir RT.
- Supernatantas atskiriamas ir ląstelės resuspenduojamos tokiame pat tūryje 0,9 % NaCl.
- Kiekvienu atveju 35 ml ląstelių NaCl užpilamos ant 15 ml Ficoll-Hipaque.
- Ląstelės ant Ficoll-Hipaque centrifuguojamos 60 minučių esant 1800 g ir RT, nenaudojant pertraukų.
- Susidaro ląstelių nuosėdos ir du sluoksniai su tarpine faze.
- Sluoksniai ir tarpinė fazė nusiurbiami ir ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 30 sekundžių 10 ml ledinio 0,2 % NaCl, ir 10 ml ledinio 1,6 % NaCl pridedama iškart po 30 sekundžių.
- Ląstelės centrifuguojamos 10 minučių esant 1800 g ir RT.
- Po to jos perplaunamos vieną kartą 10 ml PBS ir nucentrifuguojamos.
- Ląstelių nuosėdos susideda iš 95-99 % grynumo granulocitų.

- Iš šių ląstelių pagal standartines metodikas išskiriama RNR.
- Šios RNR 10 mg tirinama PRV-1 ekspresijos požiūriu Northern blot metodu. Zondu naudojama visa kDNR seka, pavaizduota sekoje ID Nr. 1.

Šis eksperimentas atliktas su 19 *p. vera* pacientų ir su 21 kontroliniu saugomo kraujo pavyzdžiu. Nustatyta, kad PRV-1 zondas ryškiai hibridizuojasi *p. vera* pacientų atveju. Sveikų individų kontroliniuose pavyzdžiuose hibridizacija nestebima.

2 pavyzdys

PRV-1 turi augimo faktoriaus aktyvumą.

Vaikingoms pelėms po 13,5 dienų nuo apvaisinimo pašalinti embrionai. Išimtos vaisiaus kepenys. Jų ląstelės pažymėtos naudojant antikūnus ir kolonėlių chromatografijos pagalba praturtintos vieno tipo ląstelėmis bei atskirtos nuo kito tipo ląstelių. Tai duoda ląstelių mišinį, praturtintą tam tikromis hematopoezės prekursoriaus ląstelėmis (kolonijas sudarantys vienetai - eritroidai, CFU-E). Taigi, jei vaisiaus kepenų ląstelėse maždaug 2 % sudaro CFU-E, praturtintose ląstelėse CFU-E sudaro 30-40 %.

Šios CFU-E transfekuojamos naudojant retrovirusą. Šiam tikslui ląstelių linija, žymima 393-T, transfekuojama prieš 48 val. 293-T yra nustatyta žmogaus embriono inkstų ląstelių linija. 393-T ląstelės transfekutos keletu retroviruso genų. Jei dabar šios 293-T ląstelės transfekuojamos dviem plazmidėmis, vadinamomis pOS ir pKAT, tada jos gamina retrovirusą, kuris gali infekuoti pelių vaisiaus kepenų ląsteles. Jei 293-T ląstelės transfekutos tuščiu pOS vektoriumi ir pKAT, gaminasi laukinio tipo retrovirusas, kuris tik ekspresuoja retroviruso baltymus. Iš kitos pusės, žmogaus geno, t.y. PRV-1 klonavimas į pOS vektorių duoda produkciją retroviruso, kuris ekspresuoja šį baltymą, užkrėtus juo ląsteles. 293-T ląstelės išskiria retrovirusą į ląstelių kultivavimo terpę.

Po dviejų dienų ląstelių kultivavimo terpė nuo transfekutų 293-T ląstelių, turinti retroviruso, surenkama ir nufiltruojama per 0,45 µm filtrą. Siekiant transfekuoti vaisiaus kepenų ląsteles, pastarosios sumaišomos su nufiltruota ląstelių kultivavimo terpė, turinčia retroviruso, ir 2 val. centrifuguojama esant 1800 aps/min ir 20 °C, pridėjus

Polybren. Po to transfekuotos vaisaus kepenų ląstelės auginamos terpėje (Methocult, iš Cell Systems), be įprastinių druskų ir aminorūgščių turinčioje fetalinio veršelio serumo, 0,0001-0,4 IU eritropoetino (EPO)/ml ir 0,8 % metilceliuliozės. CFU-E ląstelėms reikia EPO, siekiant sudaryti hepatopoetines kolonijas. Metilceliuliozė sutirština terpę iki žele pavidalo, fiksuodama atskiras ląsteles taip, kad jos, skirtingai negu skystoje terpėje, negalėtų judėti. Tokiu būdu įmanoma stebėti, ar iš pavienės ląstelės susidarė hematopoetinė kolonija, ar ne. CFU-E sudaro eritroidų kolonijas, tai yra kolonijas, turinčias raudonųjų kraujo kūnelių ir jų prekursorių.

Po trijų dienų suskaičiuojamos susidariusios hematopoetinės kolonijos. Palyginti įvairūs mišiniai. Ne visi mišiniai tirti kiekviename eksperimente; mišiniai 1-3 yra labai artimi kontroliniai mišiniai ir kiekvienas jų gali būti lyginamas su mišiniu 4.

1 mišinys: Ląstelės, kurios nebuvo transfekuotos retrovirusu;

2 mišinys: Ląstelės, kurios buvo transfekuotos tuščiu pOS vektoriumi;

3 mišinys: Ląstelės, kurios buvo transfekuotos "žalios fluorescencijos baltymu" (GFP), baltymu, kuris nėra aktyvus hematopoetiniu požiūriu;

4 mišinys: Ląstelės, kurios buvo transfekuotos pOS-PRV-1 (vektorius + genas pagal šį išradimą).

1 lentelė: lentelėje pateikti rezultatai, gauti iš aukščiau aprašytų eksperimentų. Skaičiai kiekvienu atveju reiškia kolonijų kiekį.

	1 mišinys	2 mišinys	3 mišinys	4 mišinys
	netransfekuota	tuščias vektorius (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
1 bandymas	116	156	80	326
2 bandymas		271	273	410
3 bandymas	120		131	291

Eksperimentai rodo, kad CFU-E, transfekutos PRV-1, sudaro daug daugiau kolonijų (iki trijų kartų daugiau), negu įvairios kontrolinės CFU-E. Šie rezultatai rodo, kad PRV-1 yra CFU-E augimo faktorius.

3 pavyzdys.

PRV-1 augimo faktoriaus tirpumas.

Sekantis eksperimentas atliktas siekiant ištirti, ar PRV-1 yra tirpus augimo faktorius, ar reikalingas ląstelės-ląstelės kontaktas. Ląstelių linija 293-T po transfekavimo pOS ir pKAT vektoriais produkuoja ne vien tik retrovirusą. Papildomai 293-T ląstelės taip pat sintetina baltymą, koduojamą geno, klonuoto pOS, t.y., šiuo atveju PRV-1. Jei geno produktas yra tirpus baltymas, jis išskiriamas į terpę, supančią ląstelių liniją 293-T. Jei 293-T ląstelės transfekuojamos tik pOS vektoriumi, be pKAT, retrovirusų nesusidaro. Ląstelių kultivavimo terpėje tada yra tik ląstelių gaminamas tirpus baltymas. POS-PRV-1-transfekuočių ląstelių terpė, ir kuri neturi retrovirusų, sumaišoma su CFU-E ir viskas paskleidžiama metilceliuliozės terpėje; po suskaičiuojamos susidariusios kolonijos

Gauti tokie rezultatai:

2 lentelė: PRV-1 tirpumas. Skaičiai kiekvienu atveju reiškia kolonijų kiekį.

	1 mišinys	2 mišinys	3 mišinys	4 mišinys
	netransfekuota	tuščias vektorius (pOS)	GFP (pOS-GFP)	PRV-1 (pOS-PRV-1)
4 bandymas	116	137	187	557

Šiame bandyme taip pat CFU-E ląstelės, kurios buvo paveiktos PRV-1 turinčia terpe, sudarė daug daugiau kolonijų, negu kontrolinės ląstelės. Iš šio rezultato galime daryti išvadą, kad PRV-1 yra tirpus augimo faktorius.

4 pavyzdys.

Augimo faktorius PRV-1 yra glikozilintas.

Iš pacientų, sergančių *p. vera*, išskirti granulocitai ir, pagal standartinę metodiką iš šių ląstelių pagaminti baltymo ekstraktai. Šie baltymo ekstraktai apdorojami pagal Boehringer Mannheim N-glikozidazės F deglikozilinimo rinkinio metodiką. Smulkiau, tai reiškia, kad į baltymo ekstraktą pridedama denatūracijos buferio, mišinys kaitinamas 3 min. 95 °C temperatūroje, po to veikiamas arba reakcijos buferiu, arba reakcijos buferiu plius N-glikozidazė. Kiekvienas mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje per naktį, ir baltymai analizuojami PAGE gel-elektroforezės pagalba, po to Western blot būdu. PRV-1 baltymas nustatomas pagalba antikūno, nukreipto prieš baltymą, turintį aminorūgščių seką ID Nr.5. Rezultatai rodo, kad tuo tarpu kai PRV-1 baltymas išgrynintas iš granulocitų, yra 60-65 kDa dydžio, suskaidžius N-glikozidaze, jis yra tik 40 kDa dydžio. Tai aiškiai įrodo, kad PRV-1 yra glikozilintas prie asparagino liekanų.

SEKOS

<110> Universitätsklinikum Freiburg

<120> PRV-1 genas ir jo panaudojimas

<130> E980930

<140> PCT/EP99/07238

<141> 1999-09-30

<150> 198 49 044.5

<151> 1998-10-23

<160> 9

<170> PADAT Sequenzmodul, Version 1.0

<210> 1

<211> 1600

<212> DNR

<213> *homo sapiens*

<220>

<223>

<400> 1

```

aaaagcagaa agagattacc agccacagac gggtcattgag cgcggtatta ctgctggccc   60
tcctgggggtt catcctccca ctgccaggag tgcaggcgct gctctgccag ttgggacag   120
ttcagcatgt gtggaagggtg tccgacctgc cccggcaatg gacccctaag aacaccagct   180
gcgacagcgg ctgggggtgc caggacacgt tgatgctcat tgagagcgga cccaagtga   240
gcctggtgct ctccaagggc tgcacggagg ccaaggacca ggagccccgc gtcactgagc   300
accggtggg ccccggcctc tcctgatct cctacacctt cgtgtgccgc caggaggact   360
tctgcaaaa cctcgttaac tcctcccgcc ttggggcccc acagcccca gcagaccag   420

```

gatccttgag gtgcccagtc tgcttgctta tggaaggctg tctggagggg acaacagaag 480
agatctgccc caaggggacc acacactgtt atgatggcct cctcaggctc aggggaggag 540
gcatcttctc caatctgaga gtccaggat gcatgcccc gccaggttgc aacctgtca 600
atgggacaca ggaaattggg cccgtgggta tgactgagaa ctgcaatagg aaagatttc 660
tgacctgtca tcgggggacc accattatga cacacggaaa ctgggtcaa gaaccactg 720
attggaccac atcgaatacc gagatgtgcg aggtggggca ggtgtgtcag gagacgtgc 780
tgctcataga tgtaggactc acatcaacct tggtagggac aaaaggctgc agcactgtt 840
gggctcaaaa ttcccagaag accaccatcc actcagcccc tctgggggtg ctgtggcct 900
cctataccca ctctgtctc tcggacctgt gcaatagtgc cagcagcagc agcgttctgc 960
tgaactccct cctctctcaa gctgcccctg tcccaggaga cggcagtggt cctacctgtg 1020
tgcagccctt tggaacctgt tcaagtggct cccccgaat gacctgccc aggggcgcca 1080
ctcattgtta tgatgggtac attcatctct caggaggtgg gctgtccacc aaaatgagca 1140
ttcagggtg cgtggcccaa cctccagct tctgttgaa ccacaccaga caaatcggga 1200
tcttctctgc gcgtgagaag cgtgatgtgc agcctctgc ctctcagcat gagggagggtg 1260
gggctgaggg cctggagtct ctacttggg gggtaggggt ggcactggcc ccagcgtgt 1320
ggtagggagt gggttgcct tctgtctaac tctattacc ccacgattct tcaccgtgc 1380
tgaccacca cactcaacct cctctgacc tcataaccta atggccttg acaccagatt 1440
ctttccatt ctgtccatga atcatcttc ccacacaaa tcattcatat ctactcacct 1500
aacagcaaca ctggggagag cctggagcat cggacttgc cctatgggag aggggacgt 1560
ggaggagtgg ctgcatgtat ctgataatac agacctgtc 1600

<210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Gly Phe Ile Leu Pro Leu
 1           5           10          15
Pro Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Gln Phe Gly Thr Val Gln His Val
      20           25           30
Trp Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn Thr Ser
      35           40           45
Cys Asp Ser Gly Leu Gly Cys Gln Asp Thr Leu Met Leu Ile Glu Ser
      50           55           60
Gly Pro Gln Val Ser Leu Val Leu Ser Lys Gly Cys Thr Glu Ala Lys
      65           70           75           80
Asp Gln Glu Pro Arg Val Thr Glu His Arg Met Gly Pro Gly Leu Ser
      85           90           95
Leu Ile Ser Tyr Thr Phe Val Cys Arg Gln Glu Asp Phe Cys Asn Asn
      100          105          110
Leu Val Asn Ser Leu Pro Leu Trp Ala Pro Gln Pro Pro Ala Asp Pro
      115          120          125
Gly Ser Leu Arg Cys Pro Val Cys Leu Ser Met Glu Gly Cys Leu Glu
      130          135          140
Gly Thr Thr Glu Glu Ile Cys Pro Lys Gly Thr Thr His Cys Tyr Asp
      145          150          155          160
Gly Leu Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Phe Ser Asn Leu Arg Val
      165          170          175
Gln Gly Cys Met Pro Gln Pro Gly Cys Asn Leu Leu Asn Gly Thr Gln
      180          185          190
Glu Ile Gly Pro Val Gly Met Thr Glu Asn Cys Asn Arg Lys Asp Phe
      195          200          205
Leu Thr Cys His Arg Gly Thr Thr Ile Met Thr His Gly Asn Leu Ala
      210          215          220
Gln Glu Pro Thr Asp Trp Thr Thr Ser Asn Thr Glu Met Cys Glu Val
      225          230          235          240
Gly Gln Val Cys Gln Glu Thr Leu Leu Leu Ile Asp Val Gly Leu Thr
      245          250          255
Ser Thr Leu Val Gly Thr Lys Gly Cys Ser Thr Val Gly Ala Gln Asn
      260          265          270
Ser Gln Lys Thr Thr Ile His Ser Ala Pro Pro Gly Val Leu Val Ala
      275          280          285
Ser Tyr Thr His Phe Cys Ser Ser Asp Leu Cys Asn Ser Ala Ser Ser
      290          295          300

```

Ser Ser Val Leu Leu Asn Ser Leu Pro Pro Gln Ala Ala Pro Val Pro
 305 310 315 320
 Gly Asp Arg Gln Cys Pro Thr Cys Val Gln Pro Leu Gly Thr Cys Ser
 325 330 335
 Ser Gly Ser Pro Arg Met Thr Cys Pro Arg Gly Ala Thr His Cys Tyr
 340 345 350
 Asp Gly Tyr Ile His Leu Ser Gly Gly Gly Leu Ser Thr Lys Met Ser
 355 360 365
 Ile Gln Gly Cys Val Ala Gln Pro Ser Ser Phe Leu Leu Asn His Thr
 370 375 380
 Arg Gln Ile Gly Ile Phe Ser Ala Arg Glu Lys Arg Asp Val Gln Pro
 385 390 395 400
 Pro Ala Ser Gln His Glu Gly Gly Gly Ala Glu Gly Leu Glu Ser Leu
 405 410 415
 Thr Trp Gly Val Gly Leu Ala Leu Ala Pro Ala Leu Trp Trp Gly Val
 420 425 430
 Val Cys Pro Ser Cys
 435

<210> 3
 <211> 24
 <212> RNR
 <213> *homo sapiens*

<220>
 <223>

<400> 3

aaaagcagaa agagattacc agcc

24

<210> 4
 <211> 24
 <212> RNR
 <213> *homo sapiens*

<220>
 <223>

<400> 4

ggctggtaat ctctttctgc tttt

24

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 5

Lys Val Ser Asp Leu Pro Arg Gln Trp Thr Pro Lys Asn

1

5

10

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 6

Ser Ala Arg Glu Lys Arg Asp Val Gln Pro Pro Ala Ser Gln His

1

5

10

15

<210> 7

<211> 27

<212> DNR

<213> *homo sapiens*

<220>

<223>

<400> 7

attaggttat gaggtcagag ggaggtt

27

<210> 8

<211> 28

<212> DNR

<213> *homo sapiens*

<220>

<223>

<400> 8

gcagaaagag attaccagcc acagacgg

28

<210> 9

<211> 28

<212> DNR

<213> *homo sapiens*

<220>

<223>

<400> 9

gaatcgtggg ggtaatagag ttagcagg

28

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. N-glikozilintas polipeptidas, iš esmės susidedantis iš vienos iš toliau pateiktų aminorūgščių sekų:

sekos Nr. 2 aminorūgštys 1-437;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 1-409;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 22-437;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 22-409;

arba jo fragmentas, susidedantis iš mažiausiai 50 aminorūgščių.

2. Polipeptidas, susidedantis iš vienos iš toliau pateiktų aminorūgščių sekų:

sekos Nr. 2 aminorūgštys 1-437;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 1-409;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 22-437;

sekos Nr. 2 aminorūgštys 22-409;

3. Iš esmės grynas polipeptidas, turintis seką ID Nr. 2.

4. Polinukleotidas, susidedantis iš vienos iš toliau pateiktų nukleotidų sekų:

sekos Nr. 1 nukleotidai 1-1600;

sekos Nr. 1 nukleotidai 36-1346;

sekos Nr. 1 nukleotidai 36-1262;

sekos Nr. 1 nukleotidai 39-1346;

sekos Nr. 1 nukleotidai 39-1262;

sekos Nr. 1 nukleotidai 99-1346;

sekos Nr. 1 nukleotidai 99-1262.

5. Rekombinantinė DNR, susidedanti iš polinukleotido pagal 4 punktą.

6. Rekombinantinė DNR pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad nukleotidų seka funkcionaliai surišta su promotoriumi.

7. Ekspresijos vektorius, turintis rekombinantinę DNR pagal 5 arba 6 punktą.
8. Transformuota arba transfekuota ląstelė-šeimininkė, turinti polinukleotidą pagal 4 punktą.
9. Antikūnas prieš PRV-1 polipeptidą pagal vieną iš 1-3 punktų arba jo epitopas.
10. Antikūnas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra monokloninis antikūnas.
11. *Polycythaemia vera* nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad imuninės analizės metu PRV-1 polipeptidas pagal vieną iš 1-3 punktų reaguoja su vienu ar daugiau antikūnų pagal 9 arba 10 punktą.
12. Būdas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas antikūnas yra polikloninis arba monokloninis antikūnas pagal 9 punktą.
13. *Polycythaemia vera* nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad PRV-1 polinukleotidas pagal 4 punktą nustatomas naudojant atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandinės sintezės (RT-PCR) metodiką arba blotingo metodiką.
14. Vaistas *polycythaemia vera* gydymui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad, be įprastinių užpildų, jis susideda iš polikloninių arba monokloninių antikūnų pagal 9 arba 10 punktą.
15. Vaistas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų ir bent vieno farmaciškai toleruotino užpildo.
16. Vaistas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš polinukleotido pagal 4 punktą ir bent vieno farmaciškai toleruotino užpildo.

17. Polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų panaudojimas augimo faktoriumi.
18. Polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų panaudojimas vaisto, skirto kaulų čiulpų ir kraujotakos pancitopenijų ir pancitopatijų gydymui, gamyboje.
19. Polinukleotido pagal 4 punktą panaudojimas vaisto, skirto kaulų čiulpų ir kraujotakos pancitopenijų ir pancitopatijų gydymui, gamyboje.
20. Polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų panaudojimas endogeninių ląstelių ir/arba nustatytų ląstelių linijų apdorojimui ir/arba dauginimui *ex vivo* arba *in vitro*.
21. *Polycythaemia vera* nustatymo rinkinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš:
- bent vieno polinukleotido pagal 4 punktą arba jo fragmento;
 - ir/arba bent vieno polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų,
 - ir/arba bent vieno antikūno pagal 9 ar 10 punktą.
22. Rinkinys hematopoetinės sistemos sutrikimų nustatymui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš:
- bent vieno polinukleotido pagal 4 punktą arba jo fragmento;
 - ir/arba bent vieno polipeptido pagal vieną iš 1-3 punktų,
 - ir/arba bent vieno antikūno pagal 9 ar 10 punktą.
23. Rinkinys PRV-1 baltymo nustatymui pagal 21 arba 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tai yra ELISA analizės rinkinys.

AAAAGCAGAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCATGAGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCC
TGGGGTTTCATCTCCCACTGCCAGGAGTGCAGGCGCTGCTCTGCCAGTTTGGGACAGTTCAGC
ATGTGTGGAAGGTGTCCGACCTGCCCCGGCAATGGACCCCTAAGAACACCAGCTGCGACAGCG
GCTTGGGGTGCCAGGACACGTTGATGCTCATTGAGAGCGGACCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCT
CCAAGGGCTGCACGGAGGCCAAGGACCAGGAGCCCCGCGTCACTGAGCACCGGATGGGCCCCG
GCCTCTCCCTGATCTCCTACACCTTCGTGTGCCGCCAGGAGGACTTCTGCAACAACCTCGTTA
ACTCCCTCCCGCTTTGGGCCCCACAGCCCCAGCAGACCCAGGATCCTTGAGGTGCCAGTCT
GCTTGTCTATGGAAGGCTGTCTGGAGGGGACAACAGAAGAGATCTGCCCCAAGGGGACCACAC
ACTGTTATGATGGCCTCCTCAGGCTCAGGGGAGGAGGCATCTTCTCCAATCTGAGAGTCCAGG
GATGCATGCCCCAGCCAGGTTGCAACCTGCTCAATGGGACACAGGAAATTGGGCCCCGTGGGTA
TGACTGAGAACTGCAATAGGAAAGATTTTCTGACCTGTCTATCGGGGGACCACCATATGACAC
ACGGAACCTTGGCTCAAGAACCCACTGATTGGACCACATCGAATACCGAGATGTGCGAGGTGG
GGCAGGTGTGTCAGGAGACGCTGCTGCTCATAGATGTAGGACTCACATCAACCTGGTGGGGA
CAAAAGGCTGCAGCACTGTTGGGGCTCAAAATTCCCAGAAGACCACCATCCACTCAGCCCCCTC
CTGGGGTGCTTGTGGCCTCCTATACCCACTTCTGCTCCTCGGACCTGTGCAATAGTGCCAGCA
GCAGCAGCGTTCTGCTGAACCTCCCTCCCTCAAGCTGCCCCCTGTCCCAGGAGACCGGCAGT
GTCTTACCTGTGTGCAGCCCCCTTGAACCTGTTCAAGTGGCTCCCCCGAATGACCTGCCCCA
GGGGCGCCACTCATTTGTTATGATGGGTACATTCATCTCTCAGGAGGTGGGCTGTCCACCAAAA
TGAGCATTCAGGGCTGCGTGGCCCAACCTTCCAGCTTCTTGTGTAACCACACCAGACAAATCG
GGATCTTCTCTGCGCGTGAGAAGCGTGATGTGCAGCCTCCTGCCCTCAGCATGAGGGAGGTG
GGGCTGAGGGCCTGGAGTCTCTCACTTGGGGGGTGGGGCTGGCACTGGCCCCAGCGCTGTGGT
GGGGAGTGGTTTGCCCTTCTGCTAACTCTATTACCCCCACGATTCTTACCAGCTGCTGACCA
CCCACACTCAACCTCCCTCTGACCTCATAACCTAATGGCCTTGGACACCAGATTCTTTCCCAT
TCTGTCCATGAATCATCTTCCCCACACACAATCATTCATATCTACTCACCTAACAGCAACACT
GGGGAGAGCCTGGAGCATCCGACTTGCCCTATGGGAGAGGGGACGCTGGAGGAGTGGCTGCA
TGTATCTGATAATACAGACCCTGTC

Fig. 1

LT 4877 B

MSAVLLLALLGFILPLPGVQA---LLCQFGTVQHVKVSDLPQWTPKNTSCD
SGLGCQDTLMLIESGPQVSLVLSKGCTEAKDQEPRVTEHRMGPGLSLISY
TFVCRQEDFCNNLVNSLPLWAPQPPADPGSLRCPVCLSMEGCLEGTTEEI
CPKGTTHCYDGLLRRLRGGGIFSNLRVQGCMPQPGCNLLNGTQEIGPVGMT
ENCNRKDFLTCHRGTTIMTHGNLAQEPTDWTTSNTEMCEVGQVCQETLLL
IDVGLTSTLVGTKGCSTVGAQNSQKTTIHSAPPGVLVASYTHFCSSDLN
SASSSSVLLNSLPPQAAPVPGDRQCPTCVQPLGTCSSGSPRMTCPRGATH
CYDGYIHLSGGGLSTKMSIQGCVAQPSSFLLNHTRQIGIFSAREKRDVQP
PASQHEGGGAEGLESLTWGVGLALAPALWWGVVCPSC

Fig. 2