

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

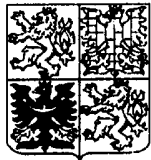
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2214-96

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05. 08. 94**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.02.94,  
25.02.94, 21.03.94, 01.06.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/196025, 94/203197,  
94/215203, 94/252491**

(33) Země priority: **US, US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 07. 97**  
(**Věstník č. 7/97**)

(86) PCT číslo: **PCT/US94/08806**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/21920**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

C 12 N	15/19
C 12 N	1/21
C 12 N	5/10
C 12 N	1/19
C 12 N	15/11
C 07 K	14/52
C 07 K	16/24
A 01 K	67/027
A 61 K	38/19
C 12 G	1/68

(71) Přihlášovatel:

ZYMOGENETICS, INC. A U. S.  
CORPORATION, Seattle, WA, US;  
University of Washington, Seattle, WA, US;

(72) Původce:

Holly Richard D., Seattle, WA, US;  
Lok Si, Seattle, WA, US;  
Foster Donald C., Seattle, WA, US;  
Hagen Frederick S., Seattle, WA, US;  
Kaushansky Kenneth, Woodinville, WA, US;  
Kuijper Joseph L., Bothell, WA, US;  
Lofton-Day Catherine E., Brier, WA, US;  
Oort Pieter J., Seattle, WA, US;  
Burkhead Steven K., Seattle, WA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,  
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Hematopoetická bílkovina, matriály  
a způsoby její přípravy**

(57) Anotace:

Tento vynález poskytuje hematopoetické bílkoviny, myší a lidské, přičemž tyto bílkoviny nebo jejich polypeptidové fragmenty (například cytokinová doména) stimulují proliferaci a diferenciaci myloidních nebo lymfoidních precursorů. Vynález se týká zejména rekombinantního thrombopoetinu (TPO), bílkoviny, která v řadě systémů stimuluje tvorbu krevních destiček z precursorových buněk kostní dřeně. Vynález rovněž poskytuje polynukleotidové molekuly kodující tyto bílkoviny, jakož i vektory (například plasmidy exprese). Vynález dále poskytuje monoklonální protilátky, jež se váží k epitopům bílkovin podle vynálezu a jež například umožňují afinitní čištění těchto bílkovin. V jiném ohledu

vynález poskytuje způsob pro detekci DNA kodující thrombopoetin ve směsi DNA molekul, který zahrnuje hybridizační sondování také této směsi oligonukleotidovou sondou, jež svou sekvencí odpovídá části DNA specifické pro thrombopoetin. Bílkoviny a polypeptidy podle vynálezu jsou užitečné zejména pro terapii in vivo a ex vivo, například pro stimulaci tvorby krevních destiček u onkologických pacientů po chemoterapii nebo radiační terapii, a vynález v tomto směru poskytuje farmaceutické prostředky, jejichž účinnou složkou je rekombinantní thrombopoetin. Bílkoviny a další materiály podle vynálezu jsou rovněž užitečné pro výzkum diferenciaci a proliferaci v systému krevních buněk.

CZ 2214-96 A3

Hematopoetická bílkovina, materiály, a způsoby její přípravy

Příl.	URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	č.j.	00572
		DOSLO	22.1.97

Tato přihláška je část pokračování přihlášky pořadového čísla 08/215,203 podaného 21. března 1984, jež je část pokračování přihlášky pořadového čísla 08/203 197 podané 25. února 1984, jež je část pokračování přihlášky pořadového čísla 08/196 025 podané 14. února 1984, kteréžto přihlášky jsou podány a jsou zde zahrnuty odkazem.

Dosavadní stav techniky

Hematopoese je proces, v němž se krevní buňky vyvíjejí a diferencují z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. Tento proces zahrnuje komplexní propojení akce polypeptidových růstových faktorů (cytokinů), působících prostřednictvím membránově vázaných receptorů na cílové buňky. Působení cytokinů vede k buněčné proliferaci a diferenciaci, přičemž odezva na konkrétní cytokin je často specifická pro určitou linii nebo stádium. Vývoj jednoho typu buněk, jako jsou destičky, z kmenových buněk, může vyžadovat koordinované působení více cytokinů, působících ve správném pořadí.

Známé cytokiny zahrnují interleukiny, jako jsou IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 a j., a kolonie stimulační faktory, jako jsou G-CSF, N-CSF, GM-CSF, erythropoietin (EPO) a j. Obecně interleukiny působí jako mediátory imunitní a zánětlivé odezvy. Kolonie stimulační faktory stimulují proliferaci buněk odvozených z dřene, aktivují maturní leukocyty, a tvoří jinak integrální součást hostitelské odezvy na zánětlivé, infekční a imunologické podněty.

Různé cytokiny byly vyvinuty jako terapeutická činidla. Například: Erythropoietin, jenž stimuluje vývoj erythrocytů, se používá v léčbě anemie, vznikající v důsledku selhání ledvin. Několik kolonie stimulačních faktorů se používá ve spojení s nádorovou terapií k urychlení obnovy imunitního systému pacienta. Interleukin-2,  $\alpha$ -interferon a  $\tau$ -interferon se používají

v léčbě určitých nádorů. Aktivita stimulující megakaryocytopoesi a thrombocytopoesi byla zjištěna v tělesných tekutinách trobocytopenických zvířat a v literatuře se na ni odkazuje jako na "thrombopoietin" (recentní přehledy McDonald, *Exp. Hematol.* 16: 201-205, 1988 a McDonald, *Am. J. Ped. Hematol. Oncol.* 14: 8-21, 1992). Navzdory více než třem dekadám výzkumu není tato aktivita definitivně charakterizována, zčásti pro nedostatek dobrého zdroje a chybějící dobrou analytickou metodu, a pro chybějící znalosti co do místa (míst) tvorby.

Mírné poruchy krvácení (mild bleeding disorders, MBDS) spojené s dysfunkcí destiček, jsou relativně běžné (Bachmann, *Seminars in Hematology* 17:292-305, 1980), jako je určitý počet vrozených poruch funkce destiček, včetně Bernardova-Soulierova syndromu (nedostatečnosti v destičkách GPIb), Glanzmannovy thrombasthenii (nedostatečnosti GPIIb a GPIIIa), vrozené afibrinogenemii (snížené nebo chybějící hladiny fibrinogenu v plazmě a destičkách), a šedého destičkového syndromu (absence  $\alpha$ -granulí). Navíc existuje určitý počet poruch spojených se sekrecí destiček, nedostatečnou uloženou zásobou, abnormalitami dráhy arachidonové kyseliny v destičkách, nedostatkem cyklooxygenasy a thromboxansyntetasy v destičkách a s defekty v aktivaci destiček (přehled: Rao a Holmsen, *Seminars in Hematology* 23:102-118, 1986). V současnosti není molekulární základ těchto poruch dobře pochopen.

Izolace a charakterizace bílkovin destiček by poskytla neocenitelné prostředky pro objasnění defektů, zakládajících mnohé dysfunkce destiček. Hlavní omezující krok podrobné molekulární analýzy spočívá v obtížích se získáváním mRNA z destiček nebo jejich prekursorů, megakaryocytů, k analýze a ke konstrukci cDNA knihovny. Destičkám chybí jádro a transkripce. Stopová množství mRNA, ještě spojených s destičkami, lze obtížně izolovat a podléhají často degradaci. Konstrukce cDNA knihoven destiček takto vyžadovala velké počty destiček, typicky z 25 až 250 jednotek celé krve (Izumi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7477-7481, 1990; Wicky et al., *Thrombosis and Hemostasis* 61:448-453, 1989; a Wenger et al., *Blood* 73:1498-1503, 1989) nebo z ferese pacientů se zvýšenými počty krevních destiček v důsledku esenciální thrombocythemie (Roth et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 705-710, 1989). Tam, kde byly izolovány cDNA

specifické pro destičky, byly mRNA pravděpodobně nejstabilnější nebo nejhojnější ze všech druhů mRNA a přestavovaly pravděpodobně jen malý zlomek z celkového kódovacího repertoáru destiček.

Alternativní cestou k cDNA knihovně destiček je izolace a konstrukce knihovny z mRNA izolované z megakaryocytů, přímých buněčných prekursorů destiček. Megakaryocyty jsou polyploidní buňky a očekává se, že budou obsahovat mRNA kódující bílkoviny destiček a megakaryocytů v celé úplnosti. Ukázalo se však obtížným izolovat megakaryocyty v dostatečném počtu a čistotě.

Současné pokroky v molekulární biologii značně zlepšily naše chápání hematopoese, ale současně ukázaly, že tento proces je krajně složitý. I když mnohé cytokiny byly charakterizovány a u některých bylo prokázáno, že mají klinickou využitelnost, v oboru stále přetrvává potřeba dalších činidel, jež stimulují proliferaci a diferenciaci myeloidních a lymfoidních prekursorů a tvorbu maturních krevních buněk. Existuje obzvláštní potřeba činidel, jež stimulují vývoj a proliferaci buněk megakaryocytové linie, včetně destiček. V oboru dále existuje potřeba činidel, jež by mohla být použita v léčbě cytopenií, včetně trombocytopenie, stavu s abnormálně nízkým počtem destiček v oběhu (méně než asi  $1 \times 10^5$  destiček/mm<sup>3</sup>), a jiných poruch destiček. Předkládaný vynález vyplňuje tyto potřeby a poskytuje další příbuzné výhody.

#### Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnutí bílkovin majících hemetopoetickou aktivitu.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí způsobů k produkci bílkovin majících hemetopoetickou aktivitu, jakož i izolovaných molekul DNA, vektorů a buněk, použitelných v rámci tohoto způsobu.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí protilátek, jež se váží k epitopům na hemetopoetické bílkovině.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí způsobů ke stimulaci produkce megakaryocytů, destiček a neutrofilů v savcích, včetně člověka.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí řady nástrojů pro použití ve studiu vývoje, diferenciaci a proliferaci buněk kostní dřeně, a v detekci chorob charakterizovaných abnormalitami ve vývoji, diferenciaci a proliferaci buněk kostní dřeně.

V jednom ohledu tento vynález poskytuje izolovanou bílkovinu, vybranou ze skupiny sestávající z a) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196; b) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 206; c) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173; d) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 175; e) alelických variant a), b), c) a d); a f) druhových homologů a), b), c), d) a e), přičemž bílkovina stimuluje proliferaci a diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů. V určitých provedeních bílkovina zahrnuje sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 379 nebo sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 353.

V podobném ohledu vynález poskytuje izolovanou polynukleotidovou molekulu kódující bílkovinu jak je uvedeno shora. V jednom provedení je polynukleotidovou molekulou molekula DNA obsahující kódující vlákno obsahující sekvenci nukleotidů Vzorce III od nukleotidu 237 po nukleotid 692 nebo sekvenci nukleotidů Vzorce IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519. V jiných provedeních tato molekula obsahuje nukleotidy 237-1241, 174-1241, 105-722, 174-722 nebo 237-722 ze Vzorce III nebo odpovídající oblasti ze Vzorce IV. Vynález dále poskytuje alelické varianty těchto molekul a DNA molekuly kódující hematopoetickou bílkovinu, kteréžto molekuly kódují bílkovinu, jež je alespoň z 80 % identická ve své aminokyselinové sekvenci s bílkovinou kódovanou jednou z uváděných částí Vzorce III nebo Vzorce IV. Jsou poskytnuty i molekuly komplementární k těmto sekvencím.

V jiném ohledu poskytuje vynález izolovanou DNA molekulu, vybranou ze skupiny sestávající z a) *EcoRI-XhoI* inzertu plasmidu pZGmp1-1081 (ATCC 69566). b) alelické varianty a), a c) DNA molekulu kódující bílkovinu, jež je alespoň z 80 % identická ve své aminokyselinové sekvenci s bílkovinou kódovanou a) nebo b),

příčemž izolovaná DNA molekula kóduje bílkovinu, mající hematopoetickou aktivitu.

V jiném ohledu poskytuje vynález vektor exprese obsahující následující funkčně spojené prvky: promotor transkripce; úsek DNA, vybraný ze skupiny zahrnující a) úsek DNA kódující hematopoetickou bílkovinu a obsahující nukleotidovou sekvenci jak je ukázána ve Vzorci III od nukleotidu 237 po nukleotid 692; b) úsek DNA kódující hematopoetickou bílkovinu a obsahující nukleotidovou sekvenci jak je ukázána ve Vzorci IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519; c) alelické varianty a) nebo b) a d) DNA úseky kódující hematopoetickou bílkovinu, jež je alespoň z 80 % identická ve své aminokyselinové sekvenci s bílkovinou kódovanou a), b) nebo c); a terminátor transkripce.

V jiném ohledu poskytuje vynález kultivované buňky, do nichž byl zaveden vektor exprese jak je uváděn shora, přičemž buňky exprimují hematopoetickou bílkovinu, kódovanou segmentem DNA. V určitých provedeních je buňkou buňka houby, savčí buňka nebo bakteriální buňka.

V jiném ohledu poskytuje vynález savce (jiného než člověka), do jehož zárodečné linie byl zaveden úsek heterologní DNA, jež kóduje hematopoetickou bílkovinu, jak se uvádí shora, přičemž savec produkuje hematopoetickou bílkovinu kódovanou řečeným úsekem DNA.

V jiném ohledu vynález poskytuje způsoby pro stimulaci produkce destiček v savci. Způsob zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství hematopoetické bílkoviny vybrané ze skupiny sestávající z a) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196; b) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173; c) alelických variant a) a b); a d) druhových homologů a), b) nebo c), přičemž bílkovina stimuluje proliferaci a diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů, v kombinaci s farmaceuticky přijatelným vehikulem.

Tyto a další aspekty vynálezu budou objasněny s odkazy na následující podrobný popis a přiložené obrázky.

### Stručný popis obrázků

Obrázek 1 je částečná restriční mapa vektoru pDX. Použité symboly jsou: SV40 ori, počátek replikace z SV40; SV40 E, enhancer SV40; MLP, adenovirový hlavní pozdní promotor; L1-3, adenovirová trojitá zaváděcí sekvence; ss, signály sestřihu; pA, místo polyadenylace.

Obrázek 2 ilustruje konstrukci plasmidu pBJ3. Použité symboly jsou: TPIp, promotor TPI1; TPIt, terminátor TPI1; AAT,  $\alpha$ -1 antitrypsin cDNA; alfa, zaváděcí sekvence alfa-faktoru; mTPO, myší TPO kódující sekvence.

### Podrobný popis vynálezu

Před podrobným popisem tohoto vynálezu může být užitečné definovat určité pojmy zde používané.

Alelická varianta: Alternativní forma genů, jež vzniká v důsledku mutace nebo pozměněný polypeptid kódovaný mutovaným genem. Mutace v genu může být mlčící (bez změny v kódovaném polypeptidu) nebo může kódovat polypeptidy mající pozměněnou aminokyselinovou sekvenci.

cDNA: Komplementární DNA, připravovaná reverzní transkripcí templátu messenger RNA, nebo klon nebo amplifikovaná kopie takovéto molekuly. Komplementární DNA může být jednovláknová nebo dvouvláknová.

Vektor exprese: Molekula DNA, lineární nebo cirkulární, která obsahuje úsek kódující bílkovinu, jež je předmětem zájmu, ve funkčním spojení s dalšími úseky, jež zajišťují jeho transkripci. Takovéto další úseky zahrnují promotorové a terminátorové sekvence, a mohou též zahrnovat jeden nebo více počátků replikace, jeden nebo více selekčních markerů, enhancer, polyadenylační signál atd. Vektory exprese se obecně odvozují z plasmidové nebo virové DNA, a mohou obsahovat úseky z obou z nich. Výraz "funkční spojení" znamená, že úseky jsou uspořádány tak, že fungují společně v zamýšlených účelech, např. že transkripce začíná v promotoru a pokračuje přes kódující sekvenci k terminátoru.

Gen: Úsek chromosomální DNA, jenž kóduje polypeptidový řetězec. Gen obsahuje jednu nebo více oblastí kódujících aminokyseliny, jež jsou v některých případech proloženy nekódujícími "intervenčními sekvencemi" ("introny"), spolu s obklopujícími nekódujícími oblastmi, které zajišťují transkripci kódující sekvence.

Molekuly komplementární k: Polynukleotidové molekuly mající komplementární posloupnost bází a opačnou orientaci v porovnání s referenční sekvencí. Například: Sekvence 5' ATGCACGGG 3' je komplementární k 5' CCCGTCCAT 3'.

Promotor: Část genu, k němuž se váže polymerasa a kde je iniciována syntéza mRNA.

Jak je zmíněno shora, tento vynález poskytuje materiály a způsoby k použití v produkci bílkovin, majících hematopoetickou aktivitu. Jak se zde používá, výraz "hematopoetický" znamená schopnost stimulovat proliferaci nebo diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů, jak se stanovuje standardními testy. Viz například Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5327-5330, 1980; a Metcalf et al., *Exp. Hematol.* 15:288-295, 1987. Typicky se buňky dřeně inkubují v přítomnosti testovaného vzorku a kontrolního vzorku. Kultury se pak hodnotí na proliferaci a diferenciaci buněk pomocí vizuálního prohlížení nebo barvení. Obzvláště výhodný test je kolorimetrické stanovení s MTT podle Mosman (*J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983; zahrnuto zde odkazem), jež bude popsáno podrobněji v příkladech, jež následují.

Tento vynález je zčásti založen na objevu aktivity, která stimuluje růst buněk prostřednictvím MPL receptoru. Tento receptor (Souyri et al., *Cell* 63:1137-1147, 1990) byl před tímto objevem receptor "sirotek", jehož přirozený ligand nebyl znám. V průběhu klonování a mutagenese, jež jsou podrobně popsány v Příkladech, které následují, vynálezci vyvinuli buněčnou linii závislou co do přežití a růstu na stimulaci dráhy spojené s MPL receptorem a schopnou autokrinní stimulace tohoto receptoru. U kondicionovaných médií těchto na interleukinu-3 (IL-3) nezávislých buněk se zjistilo, že podporují růst buněk exprimujících MPL receptor a jinak závislých na IL-3. Pokusy s protilátkovou neutralizací ukázaly, že tato aktivita nebyla spojena s IL-3 nebo IL-4 a že mohla být neutralizována rozpustnou formou MPL receptoru. Pak byla z IL-3 nezávislé buněčné linie



připravena cDNA knihovna. DNA byla použita k transfekci křečcích ledvinných buněk (baby hamster kidney, BHK) a média transfektantů byla testována na schopnost stimulovat buněčnou proliferaci závislou na MPL. Byl izolován pozitivní klon a připraven rekombinantní MPL ligand. U rekombinantní bílkoviny bylo nalezeno, že stimuluje proliferaci v širokém spektru myeloidních a lymfoidních prekursorů a obzvláště že stimuluje produkci megakaryocytů a neutrofilů z progenitorních buněk v kostní dřeni. Navíc bylo nalezeno, že rekombinantní bílkovina stimuluje produkci destiček v pokusných zvířatech. S ohledem na tuto aktivitu byla tato bílkovina nazvána thrombopoietin (TPO).

Tento vynález poskytuje izolované polynukleotidové molekuly kódující thrombopoietin. Polynukleotidové molekuly užitečné v tomto ohledu zahrnují mRNA, genomovou DNA, cDNA, syntetickou DNA a DNA molekuly generované ligací fragmentů DNA z různých zdrojů. K produkci rekombinantního TPO jsou ve většině systémů exprese výhodné DNA molekuly bez intronů. "Izolované" je míněno tak, že molekuly jsou vyňaty ze svého přirozeného prostředí. Vynález tedy poskytuje DNA molekuly prosté jiných genů, s nimiž jsou normálně spojeny. Molekuly jsou obzvláště prosté nadbytečných a nežádoucích sekvencí, a jsou ve formě vhodné k použití v geneticko-inženýrském systému produkce bílkoviny.

Sekvence cDNA klonů kódujících reprezentativní myši resp. lidské TPO bílkoviny jsou ukázány ve Vzorci III resp. Vzorci IV a odpovídající aminokyselinové sekvence jsou ukázány ve Vzorci I resp. Vzorci II. Ti, co jsou zblhlí v oboru rozpoznají, že sekvence ukázané ve Vzorcích I, II, III a IV, a genomické sekvence ukázané ve Vzorcích V a VII odpovídají jednotlivým alelám myšního nebo lidského genu a že se očekává existence alelických variací. Alelické variace DNA sekvencí ukázaných ve Vzorci III, Vzorci IV a Vzorci V, včetně těch, co obsahují mlčící mutace a těch, jejichž mutace vedou k záměnám aminokyselin, jsou v rozsahu tohoto vynálezu, jakož jsou i bílkoviny, které jsou alelickými variacemi Vzorce I a Vzorce II. Bude rovněž zřejmé, že ten, kdo je zblhlý v oboru může "inženýrovat" místa, která napomohou manipulaci nukleotidové sekvence, s použitím alternativních kodónů.

Myší a lidské sekvence zde zveřejněné jsou užitečnými nástroji pro přípravu izolovaných polynukleotidových molekul

kódujících TPO bílkoviny z jiných druhů ("druhov $\acute{e}$  homology"). V $\acute{y}$ hodn $\acute{e}$  jsou takov $\acute{e}$ to druho $\acute{v}$ e homology zahrnující sav $\acute{c}$ í homology, jako jsou bovinní, psí, prase $\acute{c}$ í, ov $\acute{c}$ í, ko $\acute{n}$ ské, a obzvlá $\acute{s}$ t $\acute{e}$  primát $\acute{u}$  bílkoviny. Metody pro využití sekven $\acute{c}$ ní informace z jednoho druhu ke klonování odpovídající polynukleotidové sekvence z druhého druhu jsou v oboru d $\acute{o}$ bře zná $\acute{m}$ e. Viz například Ausubel et al., vyd., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. Molekuly DNA podle vynálezu kódující TPO jsou ve své sekvenci obecn $\acute{e}$  alespo $\acute{n}$  z 60 %, s v $\acute{y}$ hodou alespo $\acute{n}$  z 80 % a mohou b $\acute{y}$ t z 90-95 % identické se Vzorcem III a Vzorcem IV a jejich alelickými variantami. Thrombopoietinové molekuly jsou charakteristické svou schopností vázat se k MPL receptoru z tého $\acute{z}$  druhu a stimulovat produkci destiček *in vivo*. V normálních pokusných zvířatech je TPO schopný zvýšit hladinu destiček o 100 % nebo více během 10 dnů po začátku denního podávání.

Analýza distribuce mRNA ukázala, že mRNA kódující TPO byla přítomná v několika tkáních myši a člověka, a byla hojnější v plicích, játrech, srdci, kosterním svalu a ledvině. Pro izolaci homologů z jiných druhů se tedy připraví cDNA knihovna, s v $\acute{y}$ hodou z jedné z tkání, u nichž se našla vysoká produkce mRNA. Způsoby přípravy cDNA knihoven jsou v oboru d $\acute{o}$ bře zná $\acute{m}$ e. Viz například Sambrook et al., vyd., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, a odkazy tam citované. K detekci molekul kódujících TPO se pak knihovna testuje s myší nebo lidskou cDNA, zveřejněnou zde, nebo s jejich fragmenty nebo s jednou nebo více malými sondami založenými na zveřejněných sekvencích. Zvlá $\acute{s}$ t $\acute{e}$  užitečné jsou sondy obsahující oligonukleotid alespo $\acute{n}$  o délce 14 nebo více nukleotidů až do 25 nebo více nukleotidů, jež jsou alespo $\acute{n}$  z 80 % identické s úsekem stejné délky ze Vzorce III, Vzorce IV, Vzorce V nebo jejich komplementární sekvence. Je v $\acute{y}$ hodné testovat knihovnu při nízké hybridizační "stringenci", t.j. asi 2 x SSC a hybridizační teplotě kolem 50°C za použití značených sond. Molekuly, s kterými sonda hybridizuje jsou detegovány s použitím standardních detekčních postupů. Pozitivní klony se potvrzují sekven $\acute{c}$ ní analýzou a testy aktivity, jako je na schopnost vázat homologní MPL receptor (t.j. MPL receptor ze stejného druhu jako je cDNA) nebo na stimulaci hematopoese z homologních dřev $\acute{e}$ ňových buněk.

Jak bude zřejmé tomu, kdo je zběhlý v oboru, lze použít i jiné klonovací metody.

Polynukleotidové molekuly kódující TPO (včetně alelických variant a duhových homologů molekul zde zveřejněných) lze také izolovat klonováním z buněčné linie, která produkuje MPL ligand a vykazuje autokrinní stimulaci růstu. Ve stručnosti: Faktor-dependentní buněčná linie se transfekuje k expresi MPL receptoru (Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5640-5644, 1992; Skoda et al., *EMBO J.* 12:2645-2653, 1993; a Vzorec VI), pak mutagenizuje a selektují se buňky nezávislé na faktoru. Tyto buňky se pak použijí jako zdroj TPO mRNA. Vhodné faktor-dependentní buněčné linie zahrnují IL-3-dependentní buněčnou linii BaF3 (Palacios a Steinmetz, *Cell* 41:727-734, 1985; Methey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel et al., *Blood* 64:786-790, 1984), a MO7e (Kiss et al., *Leukemia* 7:235-240, 1993). Buněčné linie závislé na růstovém faktoru mohou být založeny podle publikovaných metod (např. Greenberger et al., *Leukemia Res.* 8:363-375, 1984; Dexter et al., v Baum et al., vyd., *Experimental Hematology Today*, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980). U typického postupu se buňky vyjmou z tkáně, o niž je zájem (např. kostní dřeň, slezina, fetální játra), a kultivují v konvenčním, sérem doplněném médiu, jako je RPMI 1640 doplněné 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 15 % koňského séra a  $10^{-6}$  M hydrokortisonem. V jedno- až dvoutýdenních intervalech se seberou neadherující buňky a ke kultuře se dá čerstvé médium. Sebrané neadherující buňky se promyjí a kultivují v médiu s přidáním zdrojem růstového faktoru (např. RPMI 1640 + 10 % FBS + 5-20 % WEHI-3 kondicionovaného média jako zdroje IL3). Těmto buňkám se dává čerstvé médium v jedno- až dvoutýdenních intervalech a expandují se, jak kultura roste. Po několika týdnech až několika měsících jsou jednotlivé klony izolovány nanesením buněk na polotuhé médium (např. médium obsahující methylcelulosu), nebo pomocí limitujícího ředění. Závislost klonů na faktoru se potvrzuje kultivací jednotlivých klonů v nepřítomnosti růstového faktoru. Pro získání na růstovém faktoru závislých buněk ve vyšší frekvenci lze použít retrovirovou infekci nebo chemickou mutagenesu. Faktor-dependentní buňky se transfekují k expresi MPL receptoru, pak mutagenizují, jako např. chemickým působením,

expozicí k ultrafialovému světlu, expozicí k rentgenovému záření, nebo retrovirovou inzerční mutagenesou. Mutagenizované buňky se pak kultivují za podmínek, kdy je přežití buněk závislé na autokrinní produkci růstového faktoru, tedy v nepřítomnosti exogenního faktoru(ů) vyžadovaného u rodičovských buněk. Produkce TPO se potvrzuje testováním, jako je testování kondicionovaných médií na buňkách exprimujících a neexprimujících MPL receptor nebo testování aktivity kondicionovaných médií v přítomnosti rozpustného MPL receptoru a protilátek proti známým cytokinům.

Tento vynález také poskytuje izolované bílkoviny, jež jsou podstatně homologní s bílkovinami Vzorce I a Vzorce II a jejich druhovými homology. "Izolovaná" je myšleno tak, že bílkovina se nachází v podmínkách jiných než v přirozeném prostředí, jako je mimo krev a zvířecí tkáň. Ve výhodné formě je izolovaná bílkovina v podstatě prost jiných bílkovin, obzvláště jiných bílkovin zvířecího původu. Je s výhodou poskytnou bílkoviny ve vysoce vyčištěné formě, t.j. čistotě vyšší než 95 %, s výhodou vyšší než 99 %. Výraz "podstatně homologní" se zde používá k označení bílkovin majících 50 %, s výhodou 60 %, výhodněji alespoň 80 % sekvenční homologie se sekvencemi ukázanými ve Vzorci I nebo Vzorci II nebo jejich druhovými homology. Takovéto bílkoviny budou výhodněji z alespoň 90 % a nejvýhodněji z 95 % identické s Vzorcem I nebo Vzorcem II nebo jejich druhovými homology. Procento identity se určí konvenčními způsoby. Viz například Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, 1986 a Henikoff a Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992. Ve stručnosti: Dvě aminokyselinové sekvence se přiloží k sobě pro optimalizaci výsledku přiložení, s použitím pokuty za otevření mezery v hodnotě 10, rozšíření mezery v hodnotě 1, a hodnotící matrice "blossum 62" Henikoffa a Henikoffa (ibid.). jak je ukázána v Tabulce 1 (aminokyseliny jsou označeny standardním jednopísmenkovým kódem). Procento identity se pak počítá jako:

Celkový počet shod

x 100

[délka delší sekvence plus počet mezer zavedených  
do delší sekvence pro přiložení dvou sekvencí]

Tabulka 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
A	4																				
R	-1	5																			
N	-2	0	6																		
D	-2	-2	1	6																	
C	0	-3	-3	-3	9																
Q	-1	1	0	0	-3	5															
E	-1	0	0	2	-4	2	5														
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6													
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8												
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4											
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4										
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5									
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5								
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6							
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7						
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4					
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11			
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7		
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4	

V podstatě homologní bílkoviny jsou charakterizovány jako ty, jež mají jednu nebo více aminokyselinových záměn, delecí nebo adicí. Tyto změny jsou s výhodou menšího rázu, to je konzervativní záměny aminokyselin, jež výrazně neovlivní prostorové uspořádání a aktivitu bílkoviny (viz Tabulku 2); krátké delece, typicky jedné až asi 30 aminokyselin; a krátké N- a C-koncové extenze, jako je N-koncový methioninový zbytek, malý spojovací peptid do asi 20-25 zbytků, nebo malá extenze, jež ulehčuje purifikaci, jako je polyhistidinový trakt, antigenní epitop nebo vazebná doména. Obecně viz Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2:95-107, 1991, což je zde zahrnuto odkazem.

Tabulka 2

Konzervativní záměny aminokyselin

Bazické:	arginin
	lysin
	histidin
Kyselé:	kyselina glutamová
	kyselina asparagová
Polární:	glutamin
	asparagin
Hydrofóbní:	leucin
	isoleucín
	valin
Aromatické:	fenylalanin
	tryptofan
	tyrosin
Malé:	glycin
	alanin
	serin
	threonin
	methionin

Aminokyseliny podstatné pro aktivitu TPO mohou být identifikovány podle postupů známých v oboru, jako jsou cílená mutagenesa nebo mutagenesa "alaninovým projížděním" (Cunningham a Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989). V poslední jmenované technice se zavádějí jednotlivé alaninové mutace do každého zbytku molekuly a výsledné mutantní molekuly se testují na biologickou aktivitu (např. vazbu k receptoru, *in vivo* nebo *in vitro* proliferační aktivitu) k identifikaci aminokyselinových zbytků, které jsou kritické pro aktivitu molekuly. Místa interakce ligand-receptor mohou být rovněž stanoveny takovými technikami jako jsou nukleární magnetická rezonance, krystalografie a fotoafinitní značení. Viz například de Vos et al., *Science* 255:306-312, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodawer et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992.

Obecně se u cytokinů předpokládá struktura čtyř alfa-helixů, přičemž první a čtvrtý helix jsou nejdůležitější a jsou konzervovanější mezi členy této rodiny. S odkazem na aminokyselinovou sekvenci lidského TPO, ukázanou ve Vzorci II, porovnání sekvencí cytokinů napovídá, že tyto helixy jsou spojeny aminokyselinovými zbytky 29 a 53, 80 a 99 108 a 130, a 144 a 168 (rozhraní jsou  $\pm$  4 zbytky). Rozhraní helixů myšího (Vzorec I) a dalších TPO, jiných než lidských, může být stanoveno přiložením k lidské sekvenci. Jiné důležité strukturní aspekty TPO zahrnují cysteinové zbytky v pozicích 51, 73, 129 a 195 ze Vzorce I (odpovídající pozicím 28, 50, 106 a 172 ze Vzorce II).

Navíc mohou být bílkoviny podle vynálezu (nebo jejich polypeptidové fragmenty) spojeny s jinými bioaktivními molekulami, obzvláště s jinými cytokiny, za poskytnutí multifunkčních molekul. Například: C-koncová doména trombopoietinu může být spojena s jinými cytokiny k zesílení biologických vlastností nebo účinnosti produkce. Molekula trombopoietinu se zdá být složena ze dvou domén. První (aminokoncová) doména přibližně 150 aminokyselin je podobná co do velikosti a připomíná co do struktury erythropoietin a jiné hematopoetické cytokiny. Za první doménou je druhá doména přibližně 180 aminokyselin, která má strukturu, jež není významně podobná žádné ze známých bílkovinných struktur v databázích. Tato druhá doména je vysoce obohacena na N-vazebná glykosylační místa a na zbytky serinu, threoninu a prolinu, jež jsou znameními

O-vazebných glykosylačních míst. Takto předpokládaný vysoký obsah cukrů napovídá, že tato doména má svou roli v tom, že činí hydrofobní první doménu poměrně rozpustnější. Experimentální důkazy prokazují, že cukr spojený s druhou doménou je zapojen do správného nitrobuněčného skládání a sekrece bílkoviny v průběhu biosyntézy. Druhá doména může také mít roli v stabilizaci první domény proti proteolytické degradaci nebo v prodloužení *in vivo* poločasu molekuly, a může potencovat přenos biologického signálu nebo specifickou aktivitu bílkoviny.

Předkládaný vynález tedy poskytuje sérii nových, hybridních molekul, v nichž je druhá doména TPO spojena s druhým cytokinem. Je s výhodou připojit C-koncovou doménu TPO k C-konci druhého cytokinu. Spojení se s výhodou provede manipulací na úrovni DNA pro zajištění exprese chimérních molekul v rekombinantních systémech produkce. Výsledné molekuly se pak testují na takové vlastnosti jako je zlepšená rozpustnost, prodloužený poločas, nebo zlepšené hladiny exprese a sekrece, a farmakodynamika. Konkrétní příklady takovýchto chimérních molekul zahrnují ty, v nichž je druhá doména TPO připojena k C-konci EPO, G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-3 nebo IL-11. Jak se poznamenává výše, toto se vhodně provádí pomocí fuze DNA. Fuzovaná DNA se pak subklonuje do vhodného vektoru exprese a transformuje nebo transfekuje do hostitelských buněk nebo organismů konvenčními metodami. Výsledné fuzované bílkoviny se čistí s použitím konvenčních chromatografických purifikačních technik (např. chromatografických technik), a jejich vlastnosti se porovnávají s vlastnostmi nativního, nefuzovaného, rodičovského cytokinu. Takovéto hybridní molekuly mohou mezi bílkovinnými nebo polypeptidovými součástmi navíc obsahovat další aminokyselinové zbytky (například polypeptidovou spojku).

Navíc k hematopetickým bílkovinám zveřejňovaným shora, tento vynález zahrnuje fragmenty těchto bílkovin a polynukleotidové molekuly, které kódují tyto fragmenty. Předmětem zvláštního zájmu jsou fragmenty délky alespoň 10 aminokyselin, jež se váží k MPL receptoru, a polynukleotidové molekuly délky alespoň 30 nukleotidů, jež kódují takovéto polypeptidy. Polypeptidy tohoto typu se identifikují známými metodami vyhledávání, jako je pomocí digesce intaktní bílkoviny nebo syntézou malých, překrývajících se peptidů nebo polynukleotidů (a expresí posledně jmenovaných),



případně ve spojení s technikami strukturní analýzy, uváděnými shora. Výsledné polypeptidy se pak testují na schopnost specificky vázat MPL receptor a stimulovat buněčnou proliferaci prostřednictvím MPL receptoru. Vazba se stanovuje konvenčními metodami, jako jsou ty, co zveřejňuje Klotz, *Science* 217: 1247, 1982 ("Scatchardova analýza"). Ve stručnosti: Radioaktivně značený testovaný polypeptid se inkubuje s buňkami nesoucími MPL receptor v přítomnosti zvyšující se koncentrace neznačeného TPO. Značený polypeptid vázaný k buňkám se oddělí od volného značeného polypeptidu centrifugací přes ftalátový olej. Vazebná afinita testovaného polypeptidu se stanoví vynesemím podílu vázané značky k volné značce na svislé ose proti vázané značce na vodorovné ose. Vazebná specifita se stanoví kompeticí s cytokiny jinými než TPO. Vazbu k receptoru lze stanovit také srážením testované sloučeniny imobilizovaným MPL receptorem (nebo jeho ligand-vážící doménou). Ve stručnosti: Receptor nebo jeho část se imobilizují na nerozpustné podložce. Testovaná sloučenina se označí, např. metabolickým značením hostitelských buněk v případě rekombinantní testované sloučeniny, nebo konvenčními *in vitro* značkovacími metodami (např. radiojodací). Značená sloučenina se pak přidá k imobilizovanému receptoru, nenavázaný materiál se odstraní, a deteguje se vázaná značená sloučenina. V oboru jsou známy způsoby detekce pro řadu značek. Stimulace proliferace se vhodně stanovuje s použitím MTT kolorimetrického testu s buňkami nesoucími MPL receptor. Polypeptidy se testují na aktivitu při různých koncentracích, typicky v rozsahu 1 nM až 1 mM.

Poskytnuty jsou rovněž větší polypeptidy až do 50 nebo více zbytků, s výhodou 100 nebo více zbytků, výhodněji asi 140 nebo více zbytků, až do velikosti celé maturní bílkoviny. Například: Analýza a modelování sekvence ukázané ve Vzorci I od zbytku 51 po zbytek 195, včetně, nebo ve Vzorci II od zbytku 28 po zbytek 172, včetně, napovídají, že tyto části molekul jsou domény podobné cytokinům a schopné samostatného skládání. Zajímavé jsou také molekuly obsahující tuto základní cytokinu-podobnou doménu plus jeden nebo více dalších úseků nebo domén primárního translačního produktu. Jiné polypeptidy, jež jsou tedy předmětem zájmu, jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3

Myší TPO (Vzorec I)

Cys (zbytek 51)--Val (zbytek 196)  
Cys (51)--Pro (206)  
Cys (51)--Thr (379)  
Ser (45)--Cys (195)  
Ser (45)--Val (196)  
Ser (45)--Pro (206)  
Ser (45)--Thr (379)  
Met (24)--Cys (195)  
Met (24)--Val (196)  
Met (24)--Pro (206)  
Met (24)--Thr (379)  
Met (1)--Cys (195)  
Met (1)--Val (196)  
Met (1)--Pro (206)  
Met (1)--Thr (379)

Lidský TPO ( Vzorec II)

Cys (28)--Val (173)  
Cys (28)--Arg (175)  
Cys (28)--Gly (353)  
Ser (22)--Cys (172)  
Ser (22)--Val (173)  
Ser (22)--Arg (175)  
Ser (22)--Gly (353)  
Met (1)--Cys (172)  
Met (1)--Val (173)  
Met (1)--Arg (175)  
Met (1)--Gly (353)

Ti, co jsou zblhlí v oboru, rozeznají, že intermediární formy těchto molekul (např. ty, které mají C-konce mezi zbytky 196 a 206 Vzorce I nebo ty, které mají N-konce mezi zbytky 22 a 28 Vzorce II) jsou také předmětem zájmu, stejně jako polypeptidy mající jednu nebo více aminokyselinových záměn, delecí, inzercí, nebo N- a C-koncové extenze, uváděné výše. Předkládaný vynález tedy poskytuje hematopoetické polypeptidy o alespoň 10 aminokyselinových zbytcích, s výhodou o alespoň 50 zbytcích, s výhodněji o alespoň 100 zbytcích, a nejvýhodněji o alespoň asi 140 zbytcích délky, kde řečené polypeptidy jsou v podstatě homologní s polypeptidy o podobné délce ze Vzorce I nebo Vzorce II.

Bílkoviny podle tohoto vynálezu mohou být produkovány v buňkách upravených genetickým inženýrstvím podle konvenčních technik. Vhodnými hostitelskými buňkami jsou ty, které mohou být transformovány nebo transfekovány exogenní DNA a pěstovány v kultuře, a zahrnují bakterie, buňky hub, a kultivované buňky vyšších eukaryotů. Techniky pro manipulaci klonované DNA a pro zavádění exogenní DNA do řady hostitelských buněk jsou popsány Sambrookem et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, a Ausubelem et al., *ibid.*, což je zde zahrnuto odkazem.

Obecně je DNA sekvence kódující bílkovinu podle vynálezu funkčně spojena s promotorem a terminátorem transkripce ve vektoru exprese. Vektor běžně obsahuje jeden nebo více selekčních markerů a jeden nebo více počátků replikace, i když ti, co jsou zblhlí v oboru rozpoznají, že v určitých systémech mohou být selekční markery poskytnuty na oddělených vektorech a že replikace exogenní DNA může být zajištěna pomocí integrace do genomu hostitelské buňky. Výběr promotorů, terminátorů, selekčních markerů, vektorů a jiných prvků je záležitostí rutinního návrhu v rámci úrovně obyčejné zblhlosti v oboru. V literatuře je popsáno mnoho takovýchto prvků, a tyto jsou dostupné od komerčních dodavatelů.

Pro směrování bílkoviny podle vynálezu do sekreční dráhy hostitelských buněk se ve vektoru exprese zajišťuje sekreční signální sekvence (známá rovněž jako zaváděcí sekvence, prepro sekvence nebo pre sekvence). Sekreční signální sekvence se připojuje k DNA sekvenci, kódující bílkovinu podle vynálezu, ve

správném čtecím rámci. Sekreční signální sekvence se běžně umísťují v 5' směru od DNA sekvence kódující bílkovinu, o niž je zájem, i když určité signální sekvence mohou být umístěny jinde v DNA sekvenci, jež je předmětem zájmu (viz např. Welch et al., US patent č. 5 037 743; Holland et al., US patent č. 5 143 830). Sekrečními signálními sekvencemi mohou být ty, jež jsou normálně spojeny s bílkovinou podle vynálezu nebo mohou být z genu kódujícího jinou secernovanou bílkovinu.

Kvasinkové buňky, obzvláště buňky rodu *Saccharomyces*, jsou výhodným hostitelem pro použití v rámci tohoto vynálezu. Způsoby transformace kvasinkových buněk exogenní DNA a produkce rekombinantních bílkovin z nich jsou zveřejněny například v Kawasaki, US patent č. 4 599 311; Kawasaki et al., US patent č. 4 931 373; Brake, US patent č. 4 870 008; Welch et al., US patent č. 5 037 743; a Murray et al., US patent č. 4 845 075, což je zde zahrnuto odkazem. Transformované buňky se selektují podle fenotypu určeného selekčním markerem, běžně resistencí k léčivu nebo schopností růst v nepřítomnosti zvláštní výživné složky (např. leucinu). Výhodným vektorovým systémem pro použití v kvasinkách je vektorový systém POT1, zveřejněný Kawasakim et al. (US patent č. 4 931 373), jenž umožňuje selekci transformovaných buněk pomocí růstu na médiích obsahujících glukosu. Výhodná sekreční signální sekvence pro použití v kvasinkách je signální sekvence genu *MFa1 S. cerevisiae* (Brake et al., US patent č. 4 546 082). Vhodné promotory a terminátory pro použití v kvasinkách zahrnují promotory a terminátory genů glykolytických enzymů (viz např. Kawasaki, US patent č. 4 599 311; Kingsman et al., US patent č. 4 615 974; a Bitter, US patent č. 4 977 092, jež jsou zde zahrnuty odkazem) a genů alkoholdehydrogenasy. Viz též US patenty č. 4 900 446, 5 063 154, 5 139 936 a 4 661 454. Systémy transformace pro jiné kvasinky včetně *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago mydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia guillermondii* a *Candida maltosa* jsou v oboru známy. Viz například Gleason et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986 a Cregg, US patent č. 4 882 279.

Buňky jiných hub jsou rovněž vhodné jako hostitelské buňky. Například: Buňky *Aspergillus* lze použít podle metod McKnighta et al., US patent č. 4 935 349, jenž je zde zahrnut odkazem. Způsoby

transformace *Acremonium chrysogenum* jsou zveřejněny Suminoem et al., US patent č. 5 162 228, jenž je zde zahrnut odkazem. Způsoby transformace *Neurospora* jsou zveřejněny Lambowitzem, US patent č. 4 486 453, jenž je zde zahrnut odkazem.

Kultivované savčí buňky jsou rovněž výhodným hostitelem pro použití v rámci tohoto vynálezu. Způsoby zavádění exogenní DNA do savčích buněk zahrnují transfekci zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým (Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro a Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham a Van de Eb, *Virology* 52:456, 1973), elektroporaci (Neumann et al., *EMBO-J.* 1:841-845, 1982) a transfekci zprostředkovanou DEAE-dextranem (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987), což je zde zahrnuto odkazem. Produkce rekombinantních bílkovin v savčích buňkách je zveřejněna například Levinsonem, US patent č. 4 713 339; Hagenem et al., US patent č. 4 784 950; Palmiterem et al., US patent č. 4 579 821 a Ringoldem, US patent č. 4 656 134), což je zde zahrnuto odkazem. Výhodné kultivované savčí buňky zahrnují COS-1 (ATCC č. CRL 1650), COS-7 (ATCC č. CRL 1651), BHK (ATCC č. CRL 1632), BHK 570 (ATCC č. CRL 10314), 293 (ATCC č. CRL 1573); Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977) a buněčné linie vaječnicků čínské křečka (např. CHO-K1, ATCC č. CCL 61). Další vhodné buněčné linie jsou v oboru známé a jsou dostupné z veřejných depozitářů jako je American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Obecně jsou výhodné silné transkripční promotory, jako jsou promotory z SV-40 nebo cytomegaloviru. Viz např. US patent č. 4 956 288. Jiné vhodné promotory zahrnují promotory metalothioneinových genů (US patenty č. 4 579 821 a 4 601 978, které jsou zde zahrnuty odkazem) a adenovirový hlavní pozdní promotor.

K selekci kultivovaných savčích buněk, do nichž byla zavedena cizí DNA se běžně používá resistance k léčivům. Na takovéto buňky se běžně odkazuje jako na "transfektanty". Na buňky, které se kultivují v přítomnosti selekčního činidla a které jsou schopné přenést gen, jenž je předmětem zájmu, do progenní populace, se odkazuje jako na "stabilní transfektanty". Výhodným selektovatelným markerem je gen kódující resistenci k antibiotiku neomycinu. Selekcce se provádí v přítomnosti léčiva neomycinového typu, jako je G-418 nebo podobně. Selekcční systémy

lze použít též ke zvýšení hladiny exprese genu, o nějž je zájem: Na tento postup se odkazuje jako na "amplifikaci". Amplifikace se provádí kultivováním transfektantů v přítomnosti nízké hladiny selekčního činidla k selekci buněk,, které produkují vysoké hladiny produktů zavedených genů. Výhodným amplifikovatelným selektovatelným markerem je dihydrofolátreduktasa, které vyznačuje resistenci k methotrexátu. Lze používat i jiné geny resistance k léčivům (např. resistance k hygromycinu, multi-drogové resistance a puromycin acetyltransferasy).

Jako hostitele lze použít i jiné buňky vyšších eukaryotů, včetně hmyzích, rostlinných a ptačích buněk. Transformace hmyzích buněk a produkce cizích bílkovin v nich je zveřejněna Guarinem et al., US patent č. 5 162 222; Bangem et al., US patent č. 4 775 624; a WIPO publikaci č. 94/06463, které jsou zde zahrnuty odkazem. Použití *Agrobacterium rhizogenes* jako vektoru pro expresi genů v rostlinných buňkách bylo shrnuto v přehledu Sinkarem et al., *J. Biosci. (Bangalore)* 11:47-58, 1987.

Výhodné prokaryotické hostitelské buňky pro provádění tohoto vynálezu jsou kmeny bakterie *Escherichia coli*, i když užitečným je také *Bacillus* a jiné rody. Techniky transformace těchto hostitelů a exprese sekvencí cizích DNA klonovaných do nich jsou v oboru dobře známé (viz např. Sambrook et al., *ibid.*). Když se bílkoviny exprimují v bakteriích jako je *E. coli*, bílkovina může zůstat v cytoplasmě, typicky jako nerozpustná tělíska, nebo může být bakteriální sekreční sekvencí směrována do periplazmatického prostoru. V prvně jmenovaném případě se buňky lyzují, tělíska se shromáždí a zdenaturují s použitím např. guanidin isithiokyanátu. Denaturované bílkoviny se pak podrobí novému skládání struktury pomocí zředění denaturačního činidla. V druhém jmenovaném případě se mohou bílkoviny získat z periplazmatického prostoru v rozpustné a funkční formě pomocí rozrušení buněk (pomocí např. sonikace nebo osmotického šoku) za uvolnění obsahu periplazmatického prostoru a získání bílkoviny.

Transformované nebo transfekované hostitelské buňky se kultivují podle konvenčních postupů v kultivačním médiu obsahujícím složky výživy a další složky potřebné pro růst zvolených hostitelských buněk. V oboru je známa řada vhodných médií, včetně definovaných médií a komplexních médií: Obecně obsahují zdroj uhlíku, zdroj dusíku, esenciální aminokyseliny,

vitaminy a minerály. Média mohou podle potřeby také obsahovat takové složky, jako jsou růstové faktory nebo sérum. Růstovým médiem se obecně selektují buňky obsahující exogenně přidanou DNA, pomocí např. selekce s léčivem nebo deficiencie na esenciální výživnou složku, která je doplněna selektovatelným markerem, neseným vektorem exprese, nebo kotransfekovaným do hostitelské buňky.

V rámci tohoto vynálezu se může k produkci TPO použít technologie transgenních zvířat. Je s výhodou produkovat bílkoviny v mléčných žlázách samičího hostitelského zvířete. Exprese v mléčné žláze a následná sekrece bílkoviny, jež je předmětem zájmu, do mléka, obchází mnohé potíže, s nimiž se střetává izolace bílkovin z jiných zdrojů. Mléko se snadno shromažďuje, je dostupné ve velkých množstvích a je dobře biochemicky charakterizováno. Navíc: Hlavní bílkoviny mléka jsou v mléce přítomné ve vysokých koncentracích (od asi 1 do 15 g/l).

Z komerčního hlediska je jasně výhodné použití hostitele takového druhu, jenž má vysoký výtěžek mléka. I když lze použít menších zvířat, jako jsou myši a potkani, (a lze je preferovat ve stádiu ověřování koncepce), v rámci tohoto vynálezu je výhodné použít hospodářská zvířata včetně, ale bez omezení, prasat, koz, ovcí a hovězího dobytka. Ovce jsou obzvláště výhodné pro takové faktory jako je dřívější historie transgenese s tímto druhem, výtěžek mléka, náklady a běžná dostupnost zařízení pro sběr ovčího mléka. Pro porovnání faktorů ovlivňujících výběr hostitelského druhu viz WIPO publikaci WO 88/00239. Obecně je žádoucí vybrat plemeno hostitelského zvířete, jež bylo vyšlechtěno pro mlékárenské účely, jako je východně-fríská ovce, nebo zavést mlékárenský základ šlechtěním transgenní linie v pozdějším termínu. V každém případě se musí používat zvířata se známým, dobrým zdravotním stavem.

Pro získání exprese v mléčné žláze se používá transkripční promotor z genu mléčné bílkoviny. Geny mléčných bílkovin zahrnují geny kódující kaseiny (US patent č. 5 304 489, jenž je zde zahrnut odkazem), beta-laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin a kyselou bílkovinu syrovátky. Výhodný je promotor beta-laktoglobulinu (BLG). V případě promotoru genu ovčího beta-laktoglobulinu se obecně použije oblast alespoň proximálních 460 bp ze sekvence 5' přilehlé ke genu, i když jsou výhodné větší části 5' přilehlé

sekvence, jako je -4,25 kb úsek DNA, obsahující 5' přilehlý promotor s nekódující částí beta-laktoglobulinového genu. Viz Whitelaw et al., *Biochem. J.* 286:31-39, 1992. Vhodné jsou také podobné úseky promotorové DNA z jiných druhů.

Do konstruktů mohou být začleněny také jiné oblasti beta-laktoglobulinového genu, jako jsou genomové oblasti genu, jenž má být exprimován. Obecně se v oboru uznává, že například konstrukty bez intronů se exprimují špatně ve srovnání s těmi, jež takovéto sekvence DNA obsahují (viz Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836-840, 1988; Palmiter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:478-482, 1991; Whitelaw et al., *Transgenic Res.* 1: 3-13, 1991; WO 89/01343; WO 91/02318). V tomto ohledu je obecně výhodné použít tam, kde to lze, genomické sekvence obsahující všechny nebo některé z přirozených intronů genu kódujícího bílkovinu nebo polypeptid, jež jsou předmětem zájmu, a tedy je výhodné vložení alespoň některých intronů např. z beta-laktoglobulinových genů. Jednou takovou oblastí je úsek DNA, jenž zajišťuje sestřih intronu a RNA polyadenylace z 3' nekódující oblasti ovčího beta-laktoglobulinového genu. Když je náhradou přirozených 3' nekódujících sekvencí, může tento ovčí beta-laktoglobulinový úsek zvyšovat a stabilizovat hladiny exprese bílkoviny nebo polypeptidu, o něž je zájem. V rámci jiných provedení se oblast obklopující iniciační ATG v TPO sekvenci nahradí odpovídajícími sekvencemi z genů pro specifické mléčné bílkoviny. Takováto náhrada zajišťuje podmínky putativní tkáňově specifické iniciace pro zvýšení exprese. Je vhodné nahrazovat úplné pre-pro a 5' nekódující sekvence sekvencemi například z BLG, i když lze nahrazovat menší oblasti.

Pro expresi TPO v transgenních zvířatech se úsek DNA kódující TPO funkčně spojí s dalšími úseky DNA, potřebnými pro jeho expresi a k tvorbě jednotek exprese. Takovéto další úseky zahrnují shora zmiňovaný promotor, jakož i sekvence pro terminaci transkripce a polyadenylaci mRNA. Jednotky exprese dále zahrnou úsek DNA kódující sekreční signální sekvenci, funkčně spojený s úsekem kódujícím TPO. Sekreční signální sekvencí může být nativní TPO sekreční signální sekvence nebo sekvence z jiné bílkoviny, jako je mléčná bílkovina. Viz například von Heinje,



*Nucl. Acids Res.* 14:4683-4690, 1986; a Meade et al., US patent č. 4 873 316, jež jsou zde zahrnuty odkazem.

Konstrukce jednotek exprese k použití v transgenních zvířatech se vhodně provede inzercí TPO sekvence do plasmidového nebo fágového vektoru, obsahujícího další úseky DNA, i když jednotka exprese může být zkonstruována v podstatě ligacemi v jakékoli posloupnosti. Obzvláště vhodné je zajistit vektor obsahující úsek DNA, kódující mléčnou bílkovinu a nahradit kódující sekvenci mléčné bílkoviny sekvencí, kódující TPO polypeptid, a takto vytvořit genovou fuzi, jež obsahuje sekvence řídicí expresi genu mléčné bílkoviny. V každém případě umožňuje klonování jednotek exprese v plasmidech nebo jiných vektorech amplifikaci TPO sekvence. Je vhodné provádět amplifikaci v bakteriálních (např. *E. coli*) hostitelských buňkách, takže vektory typicky obsahují počátek replikace a selektovatelný marker, jež jsou funkční v bakteriálních hostitelských buňkách.

Jednotka exprese se pak zavede do oplodněných vajíček (včetně embryí ranného stádia) vybraného hostitelského druhu. Zavedení heterologní DNA lze dosáhnout jednou z několika cest, včetně mikroinjekcí (např. US patent č. 4 873 191), retrovirové infekce (Jaenisch, *Science* 240:1468-1474, 1988) nebo řízené integrace s použitím embryonálních kmenových (ES) buněk (přehled Bradley et al., *Bio/Technology* 10:534-539, 1992). Vajíčka se pak implantují do vejcovodů nebo děloh pseudopregnantních samic a nechají se vyvíjet k vrhu. Potomstvo nesoucí zavedenou DNA ve své zárodečné linii může přenášet tuto DNA do své progenní populace normálním Mendelovským způsobem, což umožňuje vývoj transgenních stád.

Obecné postupy produkce transgenních zvířat jsou v oboru známy. Viz například Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons et al., *Bio/Technology* 6:844-867, 1988; Wall et al., *Biol. Reprod.* 32:645-651, 1985; Buhler et al., *Bio/Technology* 9:835-838, 1991; Krimpenfort et al., *Bio/Technology* 9:844-847, 1991; Wall et al., *J. Cell. Biochem.* 49:113-120, 1992; US patenty č. 4 873 191 a 4 873 316; WIPO publikace WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; a GB 87/00458, což je zde zahrnuto odkazem. Techniky pro zavedení sekvencí cizí DNA do savců a jejich zárodečných buněk byly vyvinuty v myších. Viz např.

Gordon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384, 1980; Gordon a Ruddle, *Science* 214:1244-1246, 1981; Palmiter a Brinster, *Cell* 41:343-345, 1985; Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442, 1985; a Hogan et al., (*ibid.*). Tyto techniky byly následně adaptovány k použití na větších zvířatech, včetně hospodářských zvířat (viz např. WIPO publikace WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; Simons et al., *Bio/Technology* 6:844-867, 1988). Ve shrnutí: V nejúčinnějších dosavadních cestách pro vytvoření transgenních myši nebo hospodářských zvířat se injikuje několik set lineárních molekul DNA, jež je předmětem zájmu, do jednoho z pro-jader oplodněného vajíčka pomocí technik, jež se staly standardními v oboru. Lze použít i injekci DNA do cytoplazmy nebo zygoty.

Lze používat také produkci v transgenních rostlinách. Exprese může být zobecněná nebo řízená ke konkrétnímu orgánu, jako je hlíza. Viz Hiatt, *Nature* 344:469-479, 1990; Edelbaum et al., *J. Interferon Res.* 12:449-453, 1992; Sijmons et al., *Bio/Technology* 8:217-221, 1990; a publikace Evropského patentového úřadu EP 255 378.

TPO připravený podle tohoto vynálezu je čištěn s použitím metod obecně známých v oboru, jako je afinitní purifikace a separace založené na velikosti, náboji, rozpustnosti a jiných vlastnostech této bílkoviny. Když se bílkovina produkuje v kultivovaných savčích buňkách je s výhodou kultivovat buňky v bezsérovém kultivačním médiu, aby se omezilo množství kontaminující bílkoviny. Médium se sbírá a frakcionuje. Výhodné metody frakcionace zahrnují afinitní chromatografii na konkavalinu A nebo jiném lektinu, a takto se využije cukr přítomný na bílkovině. Bílkoviny lze rovněž čistit s použitím imobilizované bílkoviny MPL receptoru nebo jeho části vážící ligand nebo s použitím afinitní značky [tag] (např. polyhis(tidinu), substance P nebo jiného polypeptidu nebo bílkoviny, pro níž je dostupná protilátka nebo jiné specificky se vážící činidlo). Mezi bílkovinou, o níž je zájem, a finitní značkou může být zajištěno specifické štěpící místo.

Bílkoviny tohoto vynálezu mohou být terapeuticky použity všude, kde je to žádoucí pro zvýšení proliferace buněk kostní dřeně, jako je tomu v léčbě cytopenie, jako je cytopenie vyvolaná aplastickou anemií, myelodysplastickými syndromy, chemoterapií

nebo kongenitální cytopenií; u pacientů s transplantací kostní dřeně; u pacientů s transplantací kmenových buněk periferní krve; a v léčbě stavů, které způsobují selhání kostní dřeně, jako je myelodysplastický syndrom. Tyto bílkoviny jsou rovněž užitečné ke zvyšování tvorby destiček, jako je v léčbě trombocytopenie. Trombocytopenie je spojena s různorodou skupinou chorob a klinických situací, které mohou působit samostatně nebo společně k vytvoření tohoto stavu. Snížené počty destiček mohou vznikat například z poruch tvorby destiček (z příčin např. vrozených vad jako je Fanconiho syndrom, syndrom trombocytopenia absent radii, Wiskott Aldrich, Mayova Hegglinova anomálie, Bernard-Soulierův syndrom, minneapoliský syndrom, Epsteinův syndrom, montreálský destičkový syndrom a Ecksteinův syndrom), abnormální distribuce destiček, ztrát ředěním z příčin masivních transfuzí, rozkladu destiček, nebo abnormálního odstraňování destiček ve slezinách hypersplenických pacientů (např. z příčin cirrhosy nebo kongestivního srdečního selhání). Například: Chemoterapeutická léčiva používaná v nádorové terapii mohou potlačovat vývoj progenitorních buněk destiček v kostní dřeni, a výsledné trombocytopenie omezuje chemoterapii a může přinášet nutnost transfuzí. Navíc mohou určité neoplasie narušovat tvorbu a distribuci destiček. Radiační terapie, jež se používá k zabití maligních buněk zabíjí také progenitorní buňky destiček. Trombocytopenie může vznikat též z různých autoimunních poruch destiček, indukovaných léčivem, neonatální imunitou, transfúzní alloimunitou destiček a virovou infekcí (včetně HIV). Bílkoviny podle tohoto vynálezu mohou snižovat nebo odstraňovat potřebu transfúzí, a takto snižovat incidenci destičkové alloimunity. Abnormální rozklad destiček může být výsledkem: 1) zvýšené spotřeby destiček ve vaskulárních štěpech nebo traumatizované tkáni, nebo 2) imunitního mechanismu, spojeného například s trombocytopenií indukovanou léčivem, idiopatickou trombocytopenickou purpurou (ITP), autoimunitní chorobou, hematologickými poruchami a lymfomem nebo metastázující rakovinou, zahrnující kostní dřeň. Jiné indikace pro bílkovinu tohoto vynálezu zahrnují aplastickou anémii a léčivem indukované potlačení dřeně, jako následku, například, chemoterapie nebo léčby infekce HIV pomocí AZT.

Thrombocytopenie se projevuje jako zvýšené krvácení, jako je slizničné krvácení z oblasti nosu a úst nebo gastrointestinálního traktu, nebo mokvání z ran, vředů a míst injekcí.

K farmaceutickému použití se bílkoviny tohoto vynálezu formulují podle konvenčních metod pro parenterální, obzvláště intravenózní nebo subkutánní podávání. Intravenózní podávání bude injekcí nebo infuzí s typickou periodou jedné až několika hodin. Obecně budou farmaceutické prostředky obsahovat hematopoetickou bílkovinu v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem, jako je solný roztok, pufovaný solný roztok, 5 % dextrosa ve vodě a podobně. Prostředky mohou navíc obsahovat jeden nebo více excipientů, konzervační látky, solubilizéry, puфраční činidla, albumin k zábraně ztrát bílkoviny na povrchu ampule, atd. Navíc mohou být hematopoetické bílkoviny tohoto vynálezu kombinovány s jinými cytokiny, obzvláště rychle působícími cytokiny jako je faktor kmenových buněk, IL-3, IL-6, IL-11 nebo GM-CSF. Když se používá takováto kombinovaná léčba, cytokiny mohou být kombinovány v jednom přípravku nebo mohou být podávány v oddělených přípravcích. Způsoby formulace jsou dobře známé v oboru a jsou zveřejněné například v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gennaro, vyd., Mck Publishing Co., Easton PA, 1990, což je zde zahrnuto odkazem. Terapeutické dávky budou obecně v rozsahu 0,1 až 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  váhy pacienta za den, s výhodou 0,5 až 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za den, s tím, že přesnou dávku stanoví klinik podle zavedených standardů, s ohledem na povahu a vážnost stavu, jež se léčí, pacientovu minulost atd. Stanovení dávky je na úrovni obvyklé zběhlosti v oboru. Bílkoviny se běžně podávají v průběhu období až 28 dní následujících po chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně nebo dokud se nedosáhne počet destiček  $> 20\ 000/\text{mm}^3$ , s výhodou  $> 50\ 000/\text{mm}^3$ . Běžněji se bílkoviny podávají v průběhu jednoho týdne nebo kratčeji, často během období jednoho až tří dnů. Obecně je terapeuticky účinným množstvím TPO množství dostatečné k vyvolání klinicky významného vzrůstu proliferace nebo diferenciacie myeloidních nebo lymfoidních progenitorních buněk, jenž se projeví zvýšením hladin maturních buněk (např. destiček nebo neutrofilů) v oběhu. Léčba poruch destiček bude tedy trvat dokud se nedosáhne počet destiček alespoň  $20\ 000/\text{mm}^3$ , s výhodou  $50\ 000/\text{mm}^3$ . Bílkoviny tohoto vynálezu mohou být také podávány v kombinaci s jinými cytokiny, jako IL-3, -6 a -11

faktor kmenových buněk, erythropoietin, G-CSF a GM-CSF. U režimů kombinované léčby budou obecně tyto denní dávky jiných cytokinů: EPO  $\leq$  150 U/kg; GM-CSF, 5 - 15  $\mu$ g/kg; IL-3, 1 - 5  $\mu$ g/kg; a G-CSF, 1 - 25  $\mu$ g/kg. Kombinovaná léčba s EPO je například indikována u anemických pacientů s nízkými hladinami EPO.

Bílkoviny tohoto vynálezu jsou také cennými nástroji pro *in vitro* studie diferenciaci a vývoje hematopoetických buněk, jako je pro objasňování mechanismů buněčné diferenciaci a pro stanovování rodokmenů maturních buněk; uplatnění mohou nalézt rovněž jako proliferativní činidlo v tkáňových kulturách.

Bílkoviny tohoto vynálezu mohou být rovněž používány *ex vivo*, jako v autologních kulturách kostní dřeně. Ve stručnosti: Kostní dřeň se pacientovi odebere před chemoterapií a zpracuje se s TPO, případně v kombinaci s jedním nebo více jiných cytokinů. Opracovaná dřeň se pak po chemoterapii vrátí pacientovi k urychlení nápravy dřeně. Navíc mohou být bílkoviny tohoto vynálezu používány také pro *ex vivo* expanzi progenitorních buněk dřeně nebo periferní krve (PBPC). Před chemoterapeutickou léčbou může být dřeň stimulována faktorem kmenových buněk (SCF) nebo G-CSF k uvolnění progenitorních buněk do periferního oběhu. Tyto progenitory mohou být sebrány a zkoncentrovány z periferní krve a pak zpracovány v kultuře s TPO, případně v kombinaci s jedním nebo více cytokiny, včetně, ale bez omezení, SCF, G-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-6 nebo IL-11, k diferenciaci a proliferaci na megakaryocytové kultury o vysoké hustotě, jež pak mohou být vráceny pacientovi po vysoce dávkované chemoterapii.

Poskytnuty jsou také protilátky, které váží epitopy na bílkovinách tohoto vynálezu. Takovéto protilátky mohou být produkovány řadou prostředků, známých v oboru. Produkce monoklonálních protilátek jiných než lidských je dobře známa a může být prováděna například imunizací zvířete, jako je myš, potkan, králík, koza, ovce nebo morče, rekombinantním nebo syntetickým TPO nebo jejich vybranými polypeptidovými fragmenty. Výhodné je imunizovat zvíře vysoce purifikovanou bílkovinou či polypeptidovým fragmentem. Výhodné je také podávat bílkovinu nebo polypeptid v kombinaci s adjuvans, jako je Freundovo adjuvans, ke zvýšení imunitní odezvy. I když k indukci produkce protilátky ve zvířeti může postačovat jediná injekce antigenu, obecně je

výhodné podávat velkou počáteční injekci následovanou jednou nebo více "booster" injekcemi v období několika týdnů až několika měsíců. Viz např. Hurrell, vyd., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1982, což je zde zahrnuto odkazem. Ze zvířete se pak odebere a srazí krev, a protilátky se izolují ze séra s použitím konvenčních technik, jako jsou solná precipitace, ionexová chromatografie, afinitní chromatografie nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie.

Použití monoklonálních protilátek je obecně výhodnější než polyklonálních antisér. Monoklonální protilátky poskytují výhody snadné produkce, specifity a reprodukovatelnosti. Způsoby produkce monoklonálních protilátek jsou v oboru dobře známy a jsou zveřejněny například Kohlerem a Milsteinem (*Nature* 256:495, 1975 a *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976). Viz též Hurrell, *ibid.* a Hart, US patent č. 5 094 941, jež jsou zde zahrnuty odkazem. Ve stručnosti: Protilátky produkující buňky, získané z imunizovaných zvířat, jsou imortalizovány a hodnoceny, nebo napřed hodnoceny, na produkci protilátky vážící se k TPO. Pozitivní buňky se pak imortalizují fuzí s myelomovými buňkami. Protilátky jiné než lidské mohou být humanizovány podle známých technik. Viz například US patent č. 4 816 397; publikace Evropského patentového úřadu 173 494 a 239 400; WIPO publikace WO 87/02671 a WO 90/00616, jež jsou zde zahrnuty odkazem. Ve stručnosti: Geny lidské konstantní oblasti se spojují s vhodnými lidskými nebo jinými než lidskými geny pro variabilní oblast. Například aminokyselinové sekvence, jež reprezentují vazebná místa pro antigen (CDR, oblasti určující komplementaritu) rodičovské (ne-lidské) monoklonální protilátky se roubojí na úrovni DNA na sekvence lidské variabilní základní [*framework*] oblasti. Postupy této technologie jsou v oboru dobře známy a jsou zveřejněny například Jonesem et al., (*Nature* 326:522-525, 1986), Riechmannem et al. (*Nature* 322:323-327, 1989) a Queenem et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989). Spojené geny se pak transfekují do hostitelských buněk, které se pak kultivují podle konvenčních postupů. V alternativě se buňky, produkující protilátky, transfekují klonovanými geny pro lidskou konstantní oblast a geny chimerické protilátky vznikají homologní rekombinací. Takto je možné sestavit monoklonální protilátky tak,

že významná část jejich struktury je lidská, a tím zajistit protilátky, jež jsou vhodnější pro opakované podávání lidským pacientům.

Jednořetězcové protilátky lze připravit expresí rekombinantního polypeptidu, jenž je obecně složen z variabilní sekvence lehkého řetězce spojené, typicky prostřednictvím spojovacího polypeptidu, s variabilní sekvencí těžkého řetězce. Způsoby produkce jednořetězcových protilátek jsou v oboru známe a jsou zveřejněné například Davisem et al., (*Bio/Technology* 9: 165-169, 1991).

Protilátky vázící se k epitopům TPO jsou užitečné například v diagnostice chorob charakterizovaných sníženými hladinami destiček, megakaryocytů a jiných krevních nebo progenitorních buněk, přičemž tyto choroby jsou spojeny s deficiencí v proliferaci nebo diferenciaci progenitorních buněk. Takováto diagnostika se obecně provádí testováním krve nebo plazmy s použitím konvenčních metod imunotestů, jako je s enzymy spojené imunoabsorpční stanovení radioimunotest. Stanovení tohoto typu jsou v oboru dobře známa. Viz například Hart et al., *Biochem.* 29:166-172, 1990; Ma et al., *British Journal of Haematology* 80: 431-436, 1992; a Andre et al., *Clin. Chem.* 38/5: 758-763, 1992. Diagnostické testy mohou být užitečné k identifikaci populací pacientů, kteří mohou nejpravděpodobněji mít prospěch z terapie TPO. Protilátky k TPO jsou také užitečné při čištění TPO, jako při zakotvení protilátky k pevnému nosiči, jako je zrnitá matrice naplněná do kolony, a průtok roztoku obsahujícího bílkovinu touto kolonou. Navázaná bílkovina je pak eluována patřičným pufrům. Obecně se bílkovina navazuje ke koloně za fyziologických podmínek nízké iontové síly a pH blízko neutrálního. Kolona se pak promývá k eluci nenavázaných kontaminujících složek. Eluce navázané bílkoviny se provádí změnou iontové síly a pH, jako s 3M KSCN (jednoduše nebo gradientem) nebo s citrátovým pufrům o nízkém pH. Obecně je potřeba vyhnout se pH pod asi 2,5.

Tento vynález poskytuje také způsoby pro produkci velkých počtů megakaryocytů nebo destiček, které mohou být použity například pro přípravu knihoven cDNA. Protože destičky jsou směřovány k místům poranění, soudí se o nich, že jsou prostředníky hojení ran a, za určitých podmínek, prostředníky patogenese. Podrobné pochopení molekulární biologie destiček

a megakaryocytů by tudíž mohlo vnášet jasno do funkce homeostáze a klinicky relevantních poruch funkce destiček. Bílkoviny tohoto vynálezu poskytují lepší prostředky k přípravě knihoven cDNA megakaryocytů nebo destiček.

Rekombinantní thrombopoietin indukuje proliferaci megakaryocytů z prekursorových buněk když je podáván zvířatům nebo aplikován na kultivované buňky sleziny nebo kostní dřeně. Expanze megakaryocytů a jejich prekursorů a maturace megakaryocytů po podávání TPO umožňuje izolaci megakaryocytů ve vysoké čistotě a v počtu postačujícím k izolaci mRNA a konstrukci knihoven cDNA. Nastavení dávkování TPO a režimu podávání mohou být z primárních buněk sleziny nebo kostní dřeně selektivně expandovány megakaryocyty v ranné nebo plné maturaci a megakaryocyty, které se aktivně šíří. Podle toho mohou být konstruovány reprezentativní cDNA knihovny odpovídající ranným, intermediárním nebo pozdním fázím megakaryopoese.

Použití výsledných cDNA knihoven je mnohé. Takovéto knihovny mohou například být použity k identifikaci a klonování bílkovin o malém výskytu, jež hrají roli v různých dysfunkcích destiček. Snadnost, s níž lze pacientovy destičky expandovat a izolovat jejich mRNA k analýze velice napomáhá molekulárnímu zhodnocení choroby. Knihovny mohou být rovněž zdrojem pro klonování nových růstových faktorů a jiných bílkovin s potenciální terapeutickou využitelností. Užitečné destičkové bílkoviny již klonované zahrnují růstový faktor odvozený z destiček (Ross et al., *Cell* 26:155-169, 1986); transformující růstový faktor (Miletich et al., *Blood* 54:1015-1023, 1979; Roberts a Sporn, *Growth Factors* 8:1-9, 1993); z destiček odvozený růstový faktor endothelových buněk (Miletich et al., *Blood* 54:1015-1023, 1979) a PF-4 Doi et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:898-904, 1987; Poncz et al., *Blood* 69:219-223, 1987). Nové růstové faktory mohou být identifikovány v cDNA knihovnách exprese vyhledáváním funkčními testy nebo vyhledáváním pomocí hybridizace se sondami známých růstových faktorů při snížené "stringenci". Navíc: Systematické a úplné DNA sekvenování knihovny poskytuje databázi sekvencí cDNA megakaryocytů. V takovéto databázi lze "dolovat" užitečné sekvence řadou počítačových vyhledávacích algoritmů.

Megakaryocyty připravené jak se zveřejňuje shora mohou být použity rovněž k přípravě knihovny bílkovin. Tato knihovna



bílkovin je komplementární ke knihovně cDNA. Informace o aminokyselinových sekvencích získané z knihovny bílkovin umožňují rychlou izolaci cDNA kódujících bílkoviny, jež jsou předmětem zájmu. Použití dat o sekvencích bílkovin pro návrhy primerů k izolaci DNA odstraňuje problémy, které vznikají u konvenčních metod přípravy knihoven pro různou relativní hojnost mRNA. Spojení knihoven bílkovin a cDNA rovněž umožňuje cílené klonování sekvencí, o něž je zvláštní zájem.

Knihovna bílkovin se připravuje extrakcí bílkovin (celkové bílkoviny nebo frakce, o něž je zájem) z megakaryocytů podle známých metod, pak separací bílkovin dvojrozměrnou gelovou elektroforézou. Izolované bílkoviny se pak podrobí tryptické digesci *in situ*, následované separací pomocí mikroporézní HPLC. Separované fragmenty se pak analyzují hmotovou spektrometrií. Výsledný hmotnostní profil se zkoumá proti databázi bílkovinných sekvencí k odvození identity bílkoviny. Neidentifikované peptidy mohou být sekvenovány Edmanovou degradací.

Knihovny cDNA a bílkovin jsou cennými zdroji nových bílkovin a sekvencí, jež je kódují. O destičkách se soudí, že jsou důležitými prostředníky hojení ran a, za určitých okolností, prostředníky patogenese. Bylo identifikováno a charakterizováno mnohé důležité bílkoviny destiček včetně růstového faktoru odvozeného z destiček, transformujícího růstového faktoru- $\beta$ , z destiček odvozeného růstového faktoru endothelových buněk a destičkového faktoru 4. Identifikace a charakterizace dalších bílkovin destiček by byla krajně prospěšná pro objasňování procesů, jež jsou základem hojení ran a patogenese, a dalo by se od ní očekávat, že poskytne důležitá terapeutická činidla a strategie.

Jak se popisuje podrobněji níže, gen lidského TPO byl lokalizován na chromosomu 3q26. Tato informace ve spojení se sekvencí genu lidského TPO (Vzorec V) umožňuje přímou diagnózu (genetickým hodnocením) dědičných poruch v genu TPO nebo v regulaci jeho exprese. Takovéto poruchy zahrnují změny v promotorových sekvencích, jež vedou k vzrůstu nebo poklesu v hladině exprese, chromosomové translokace v kódujících nebo nekódujících oblastech, a juxtapozice nových regulačních sekvencí k TPO lokusu. Diagnostické metody, které lze používat, jsou v oboru známé. Například: Primery nebo hybridizační sondy o délce

alespoň 5 nukleotidů, s výhodou o 15 - 30 nukleotidů nebo více, mohou být navrženy z genomické sekvence a použity k detekci chromosomálních abnormalit nebo k měření hladin mRNA. Řada vhodných detekčních a měřicích metod je v oboru známa, a zahrnuje Southernův přenos, polymerasovou řetězovou reakci (Mullis, US patent č. 4 683 202) a ligasovou řetězovou reakci (Barany, *PCR Methods and Applications* 1:5-16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991). Například: Pacientova DNA může být digerována jedním nebo více restričních enzymů a přenesena na nitrocelulosu k vytvoření "Southern" přenosu. Přenesený materiál se pak sonduje k detekci hrubých změn ve velikosti fragmentů jako následku mutací v rekogniční sekvenci restričního místa. V jiném postupu dovoluje analýze abnormální genové sekvence a porovnání s normálními a abnormálními sekvencemi návrh primerů, které mohou být použity k identifikaci abnormálního (např. přerušeno nebo translokovaného) genu. Pacientova DNA se amplifikuje polymerasovou řetězovou reakcí k detekci amplifikačních produktů charakteristických pro normální gen nebo pro konkrétní přeuspořádání genu.

Vynález je dále objasněn následujícími neomezuujícími příklady.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

##### Izolace cDNA lidského *MPL* receptoru

cDNA kódující isoformy lidských *MPL-P* a *MPL-K* receptorů byly izolovány z lidských erythroidních leukemických (HEL) buněk (Martin a Papayannopoulou, *Science* 216: 1233-1235, 1982) reverzně-transkriptasovou polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) s použitím primerů připravených k publikované sekvenci kódující amino- a karboxylové konce těchto receptorů (Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5640-5644, 1992). Templátová cDNA HEL buněk byla syntetizována z poly d(T)-selektované poly(A)<sup>+</sup> RNA

s použitím primeru ZC5499 (CGAGCCACTT TCTGCACTCC TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TT). Třináct  $\mu\text{l}$  poly(A)<sup>+</sup> RNA HEL buněk o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bylo smícháno s 3  $\mu\text{l}$  20 pmol/ $\mu\text{l}$  roztoku primeru prvního vlákna ZC5499 (CGAGCCACTT TCTGCACTCC TCGAGTTTTT TTTTTTTTTT TT). Směs byla zahřívána na 65°C po 4 minuty a ochlazená chlazením na ledu.

Syntéza prvního vlákna cDNA byla spuštěna přidáním 8  $\mu\text{l}$  pufru prvního vlákna (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (5x SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> pufr; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 4  $\mu\text{l}$  100 mM dithiothreitolu a 3  $\mu\text{l}$  roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-methyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ). Reakční směs byla zahřívána na 45°C po 4 minuty s následným přidáním 10  $\mu\text{l}$  200 U/ $\mu\text{l}$  roztoku RNasy H<sup>-</sup> reverzní transkriptasy (SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> reverzní transkriptasa, GIBCO BRL) ke směsi RNA-primer. Reakce byla inkubována při 45°C po 1 hodinu s následnou inkubací při 50°C po 15 minut. K reakci bylo přidáno šedesát  $\mu\text{l}$  TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) a následovala chromatografie přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (CHROMA SPIN+TE400<sup>TM</sup>; Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) k odstranění přebytku primeru.

cDNA prvního vlákna HEL buněk se použila jak templát pro amplifikaci lidského MPL-P receptoru s použitím primerů odpovídajících oblasti kódující amino- a karboxylové konce receptorové bílkoviny (Vigon et al., ibid.). Každý primer také zahrnoval různé restriční enzymové štěpící místo, jež posloužilo k směrovanému klonování amplifikovaného produktu (ZC5746, GAGAGAGAGA GAGAATTCAT GCCCTCCTGG GCCCTCTTCA TGGTC, obsahoval Eco RI místo; ZC5762, AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT, obsahoval Xho I místo). Byla sestavena 100  $\mu\text{l}$  reakční směs, jež obsahovala 10 ng templátové cDNA, po 50 pmolů primerů, 200  $\mu\text{M}$  každý deoxynukleotid trifosfát (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 1  $\mu\text{l}$  10x PCR pufru (Promega Corp., Madison, WI), a 10 jednotek Taq polymerasy (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). Polymerasová řetězová reakce byla nechána běžet po 35 cyklů (1 minuta při 95°C, 1 minuta při 60°C, a 2 minuty při 72°C, s jednou další vteřinou přidávanou v každém následujícím cyklu), s následující 10 minutovou inkubací při 72°C.

cdNA lidského *MPL-K* receptoru byla izolována amplifikací polymerasovou řetězovou reakcí z cdNA HEL buněk způsobem identickým s cdNA *MPL-P* receptoru, jak je popsán shora, až na to že primer ZC5762, AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT, byl nahrazen ZC5742 (GACCCTGGAG CYGCGCCCGC GATCTCGCTA). PCR primer ZC5742 je specifický pro 3' konec lidské *MPL-P* cdNA a zahrnoval *Xho* I místo k usnadnění klonování.

Reakční produkty byly extrahovány dvakrát fenol/chloroformem (1:1), pak jednou chloroformem a byly sraženy ethanolem. Po digesci *Eco* RI a *Xho* I byly produkty frakcionovány na 0,8 % gelu nízkotající agarosy (SEA PLAQUE GTG<sup>TM</sup> nízkotající agarosa; FMC Corp., Rockland, ME). 1,9 Kb amplifikovaný produkt odpovídající cdNA lidského *MPL-P* receptoru a 1,7Kb amplifikovaný produkt odpovídající cdNA lidského *MPL-K* receptoru byly získány z vyřezaných proužků gelu digescí gelové matrice  $\beta$ -agarasou (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) s následným sražením ethanolem. cdNA byly subklonovány do vektoru pBluescript<sup>R</sup> SK+ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) pro ověření sekvenováním.

## Příklad 2

### Izolace cdNA myšního *MPL* receptoru

Byly vyňaty sleziny z C57BL/KsJ-db/db myši a okamžitě dány do kapalného dusíku. Celková RNA z tkáně slezin byla připravena s použitím guanidin isothiokyanátu (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18:52-94, 1979) s následným krokem CsCl centrifugace. Slezinná poly(A)<sup>+</sup> RNA byla izolována s použitím chromatografie na oligo d(T) celulóse (Aviv a Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412, 1972).

Sedm a půl  $\mu$ l poly d(T)-selektované poly(A)<sup>+</sup> RNA myších slezin o koncentraci 1,7  $\mu$ g/ $\mu$ l bylo smícháno s 3  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l roztoku primeru prvního vlákna ZC6091 (GAGCACAGAA TTCCTACTC GAGGCGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT) obsahujícího restrikční místo *Not* I. Směs byla zahřívána na 65°C po 4 minuty a ochlazená chlazením na ledu. Syntéza prvního vlákna cdNA byla spuštěna

přidáním 8  $\mu\text{l}$  250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$  (5x SUPERSRIPT<sup>TM</sup> pufr; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 4  $\mu\text{l}$  100 mM dithiothreitolu a 3  $\mu\text{l}$  roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-methyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) ke směsi RNA-primer. Reakční směs byla inkubována při 45°C po 4 minuty s následným přidáním 10  $\mu\text{l}$  200 U/ $\mu\text{l}$  roztoku RNasy H<sup>-</sup> reversní transkriptasy (GIBCO BRL). Účinnost syntézy prvního vlákna byla analyzována v paralelní reakci přidáním 10  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$  k 10  $\mu\text{l}$  alikvotu reakční směsi ke značení reakce pro analýzu. Reakce byly inkubovány při 45°C po 1 hodinu s následnou inkubací při 50°C po 15 minut. Neinkorporovaný  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$  ve značené reakci byl odstraněn chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (CHROMA SPIN + TE400<sup>TM</sup>; Clontech Laboratories Inc.). Neinkorporované nukleotidy v reakci neznačeného prvního vlákna byly odstraněny dvojím srážením cDNA v přítomnosti 8  $\mu\text{g}$  glykogenového nosiče, 2,5 M octanu amonného a 2,5 objemu ethanolu. Neznačená cDNA byla resuspendována v 50  $\mu\text{l}$  vody pro použití v syntéze druhého vlákna. Délka značeného prvního vlákna cDNA byla stanovena elektroforézou v agarosovém gelu.

Syntéza druhého vlákna byla prováděna na prvním vlákně cDNA za podmínek, jež podporují startování syntézy druhého vlákna prvním vláknem s výslednou tvorbou DNA smyček. Reakční směs se sestavovala za pokojové teploty a skládala se z 50  $\mu\text{l}$  cDNA neznačeného prvního vlákna, 16,5  $\mu\text{l}$  vody, 20  $\mu\text{l}$  5 x pufru pro polymerasu I (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM KCl, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM dithiothreitolu, 2  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího po 10 mM koncentraci všech deoxynukleotid trifosfátů, 3  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku  $\beta$ -NAD, 15  $\mu\text{l}$  3 U/ $\mu\text{l}$  roztoku *E. coli* DNA ligasy (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) a 5  $\mu\text{l}$  10 U/ $\mu\text{l}$  roztoku *E. coli* DNA polymerasy I (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Reakce byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě s následujícím přidáním 1,5  $\mu\text{l}$  2U/ $\mu\text{l}$  roztoku RNasy H (GIBCO BRL). K monitorování účinnosti syntézy druhého vlákna byla použita paralelní reakce, v níž byl 10  $\mu\text{l}$  alikvot směsi pro syntézu druhého vlákna značen 10  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$ . Reakce byly inkubovány při 15°C po dvě hodiny s následnou inkubací 15 minut při pokojové teplotě. Neinkorporovaný  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$  ve značené reakci byl před analýzou pomocí elektroforézy v agarosovém gelu

odstraněn chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (CHROMA SPIN + TE400<sup>TM</sup>; Clontech Laboratories Inc.). Neznačená reakce byla ukončena dvojí extrakcí fenol/chloroformem (1:1) a extrakcí chloroformem, s následnou ethanolovou precipitací v přítomnosti 2,5 M octanu amonného.

Jednovláknová DNA ve struktuře smyčky byla štěpena s použitím rostlinné ("mung bean") nukleasy. Reakční směs obsahovala 100  $\mu$ l cDNA druhého vlákna, 20  $\mu$ l 10x nukleasového pufru (Stratagene Cloning Systems La Jolla, CA), 16  $\mu$ l 100 mM dithiothreitolu, 51,5  $\mu$ l vody a 12,5  $\mu$ l 1:10 ředění "mung bean" nukleasy (Promega Corp.; konečná koncentrace 10,5 U/ $\mu$ l) v ředícím "mung bean" nukleasovém pufru. Reakce byla inkubována při 37°C po 15 minut. Reakce byla ukončena přidáním 20  $\mu$ l 1 M Tris-HCl, pH 8,0, s následnou postupnou extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora. Po extrakci byla DNA sražena v ethanolu a resuspendována ve vodě.

V resuspendované cDNA byly zatupeny konce T4 DNA polymerasou. cDNA, která byla resuspendovaná ve 190  $\mu$ l vody, byla smíchána s 50  $\mu$ l 5x T4 DNA polymerasového pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 3  $\mu$ l 0,1 M dithiothreitolu, 3  $\mu$ l roztoku obsahujícího po 10 mM koncentraci všech deoxynukleotid trifosfátů, 4  $\mu$ l 1 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA polymerasy (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN). Po inkubaci po 1 hodinu při 10°C byla reakce ukončena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA, s následnou seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora. DNA byla chromatografována přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) k odstranění stopových množství bílkovin a k odstranění krátkých cDNA o délce méně než -400 bp. cDNA byla sražena ethanolem v přítomnosti 12  $\mu$ g glykogenového nosiče a 2,5 M octanu amonného, a byla resuspendována v 10  $\mu$ l vody. Na základě inkorporace <sup>32</sup>P- $\alpha$ dCTP byl výtěžek cDNA určen jako -2  $\mu$ g z počátečních 12,5  $\mu$ g mRNA templátu.

Na 5' konce této cDNA byly zaligovány *Eco* RI adaptory pro umožnění klonování do lambda fágového vektoru. 10  $\mu$ l alikvot cDNA (-2  $\mu$ g) a 10  $\mu$ l 65 pmol/ $\mu$ l roztoku *Eco* RI adaptorů (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) bylo smícháno s 2,5  $\mu$ l 10x ligasového pufru (Promega Corp.), 1  $\mu$ l 10 mM ATP a 2,5  $\mu$ l 15 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA ligasy (Promega Corp.). Reakce byla inkubována přes noc (-18

hodin) při teplotním gradientu 0°C až 18°C 15 minut. Reakce byla dále inkubována přes noc při 12°C. Reakce byla ukončena přidáním 75 µl vody a 10 µl 3 M octanu sodného, s následující inkubací při 65°C po 30 minut. Po inkubaci byla cDNA extrahována fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora a precipitována v přítomnosti 2,5 M octanu amonného a 1,2 objemu isopropanolu. Po centrifugaci byla cDNA peleta myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 89 µl vody.

K zajištění jednosměrného klonování této cDNA do lambda fágového vektoru byla tato cDNA digerována *Not* I, což dalo cDNA mající 5' *Eco* RI a 3' *Not* I lepivé konce. Restrikční místo *Not* I na 3' konci cDNA bylo dříve zavedeno s primerem ZC6091 (GAGCACAGAA TTCACTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT). Digescce restrikčním enzymem byla prováděna v reakci obsahující 89 µl cDNA popsané shora, 10 µl 6 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM DTT (10x D pufr, Promega Corp., Madison, WI) a 1 µl 12U/µl *Not* I (Promega Corp.). Reakce byla ukončena seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem. cDNA byla sražena ethanolem, myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 20 µl 1x nakládacího gelového pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % glycerol a 0,125 % bromfenolová modř).

Resuspendovaná cDNA byla zahřáta na 65°C po 5 minut, ochlazena na ledu a podrobena elektroforéze na 0,8 % gelu nízkotající agarosy (SEA PLAQUE GTG<sup>TM</sup> nízkotající agarosa, FMC Corp.). Neinkorporované adaptory a cDNA pod délku 1,6 Kb byly vyříznuty z gelu. Elektrody byly přehozeny a cDNA byla podrobena elektroforéze dokud se nezkoncentrovala blízko počátku dráhy. Oblast obsahující zkoncentrovanou cDNA byla vyříznuta a dána do mikrocentrifugační zkumavky a byl stanoven přibližný objem řezu gelu. Do zkumavky byl přidán alikvot vody (300 µl), přibližně trojnásobného objemu řezu gelu, a agarosa byla roztavena zahřátím na 65°C po 15 minut. Po ekvilibraci vzorku na 42°C, bylo přidáno 10 µl 1U/µl β-agarasy (New England Biolabs, Inc.) a směs byla inkubována 90 minut k digesci agarosy. Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 40 µl 3 M octanu sodného a směs byla inkubována na ledu po 15 minut. Vzorek byl centrifugován při 14 000 x g po 15 minut za pokojové teploty k odstranění nezdigerované agarosy. cDNA byla ze supernatantu sražena ethanolem, myta 70 %-ním ethanolem,

usušena na vzduchu a resuspendována v 37  $\mu$ l vody na kinasovou reakci k fosforylaci zaligovaných *Eco* RI adaptorů.

K 37  $\mu$ l roztoku cDNA popsaného shora se přidalo 10  $\mu$ l 10x ligasového pufru (Stratagene Cloning Systems) a směs byla zahřívána na 65°C po 5 minut. Směs byla ochlazena na ledu a přidalo se 5  $\mu$ l 10 mM ATP a 3  $\mu$ l 10 U/ $\mu$ l T4 polynukleotid kinasy (Stratagene Cloning Systems). Reakce byla inkubována při 37°C po 45 minut a ukončena zahříváním na 65°C po 10 minut s následující seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem. Fosforylovaná cDNA byla sražena ethanolem v přítomnosti 2,5 M octanu amonného, myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 12,5  $\mu$ l vody. Koncentrace fosforylované cDNA byla stanovena na -40 fmol/ $\mu$ l.

Výsledná cDNA byla klonována do lambda fágového vektoru  $\lambda$ ExCell<sup>TM</sup> (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), zakoupeného jako predigerovaného s *Eco* RI a *Not* I a defosforylovaného. Ligace cDNA do vektoru se provedla v reakci obsahující 2  $\mu$ l 20 fmol/ $\mu$ l preparovaných ramen  $\lambda$ ExCell<sup>TM</sup>, 4  $\mu$ l vody, 1  $\mu$ l 10x ligasového pufru (Promega Corp.), 2  $\mu$ l 40 fmol/ $\mu$ l cDNA a 1  $\mu$ l 15 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA ligasy (Promega Corp.). Ligace se prováděla po 48 hodin při 4°C. Přibližně 50 % ligační směsi bylo "baleno" do fága s použitím "balícího" extraktu GIGAPACK<sup>R</sup> II Gold (Stratagene Cloning Systems) podle instrukcí výrobce. Výsledná knihovna cDNA obsahovala více než  $1,5 \times 10^7$  nezávislých rekombinantů s hladinou pozadí fágů bez inzertů nižší než 1,5 %.

K izolaci cDNA myšního *MPL* receptoru z fágové knihovny cDNA myší sleziny se použila sonda <sup>32</sup>p-značené cDNA lidského *MPL*-*K* receptoru. Knihovna cDNA byla nanesena na buňky *E. coli* kmene SURE<sup>R</sup> (Stratagene Cloning Systems) při hustotě 40 000 až 50 000 PFU/misku o průměru 150 mm. Fágové plaky ze třiceti tří misek byly přeneseny na nylonové membrány (Hybond<sup>TM</sup>; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) a zpracovány podle instrukcí výrobce. Zpracované filtry byly upečeny ve vakuové peci při 80°C po 2 hodiny a následovalo několik mytí při 70°C v promývacím pufru (0,25 x SSC, 0,25 % SDS, 1 mM EDTA) a prehybridizace přes noc při 65°C v hybridizačním roztoku (5x SSC, 5x Denhardtův roztok, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA a 100  $\mu$ g/ml tepelně denaturované DNA lososího spermatu) v hybridizační peci (model HB-2; Techne Inc., Princeton, NJ). Po prehybridizaci byl hybridizační roztok



odstraněn a nahrazen čerstvým hybridizačním roztokem obsahujícím přibližně  $2 \times 10^6$  cpm/ml  $^{32}\text{P}$ -značené cDNA lidského *MPL-K* připravené s použitím komerčně dostupné soupravy pro značení (souprava MEGAPRIME<sup>TM</sup>; Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Před přidáním do hybridizačního roztoku byla sonda denaturována při 98°C po 5 minut. Hybridizace byla při 65°C přes noc. Filtry byly promývány při 55°C v promývacím pufru (0,25 x SSC, 0,25 % SDS, 1 mM EDTA) a autoradiografovány s intenzifikační fólií po 4 dny při -70°C na XAR-5 film (Kodak Inc., Rochester, NY). S použitím autoradiogramu jako templátu byly z oblastí misek odpovídajících primárním signálům získány agarové válečky a ponořeny do SM (0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 % želatina) k eluci fága k purifikaci plaku. Bylo izolováno sedm fágů purifikovaných plaků, jež nesly inzerty hybridizující se sondou lidského *MPL-K* receptoru. Fagemidy obsažené v rámci *\ExCell*<sup>TM</sup> fágů byly získány s použitím *in vivo* rekombinačního systému v souladu s instrukcemi dodavatele. Identita cDNA inzertů byla potvrzena sekvenováním DNA.

Izolované klony kódovaly bílkovinu vykazující vysoký stupeň sekvenční identity s lidským *MPL-P* receptorem a s nedávno oznámeným myším *MPL* receptorem (Skoda et al., *EMBO J.* 12: 2645-2653, 1993). Sedm klonů spadalo do dvou tříd, jež se od sebe lišily třemi klony, majícími deleci sekvencí kódujících posloupnost 60 aminokyselinových zbytků blízko N-konce. Na cDNA kódující bílkovinu bez této delece se odkazuje jako na cDNA *MPL* receptoru typu I. cDNA *MPL* receptoru typu II chyběly sekvence kódující zbytky 131 až 190 receptoru typu I, Vzorec VI. Navíc se receptory typu I a II lišily od oznámené sekvence myšího *MPL* receptoru (Skoda et al., *ibid.*) přítomností sekvence kódující aminokyselinové zbytky Val-Arg-Thr-Ser-Pro-Ala-Gly-Glu vnesené za aminokyselinový zbytek 222 a substitucí glycinového zbytku serinem v pozici 241 (pozice odkazují na myší receptor typu I).

cDNA myších *MPL* receptorů typu I a II byly k expresi v savcích buňkách subklonovány do plasmidového vektoru pHZ-1. Plasmid pHZ-1 je vektor exprese, jež může být k expresi bílkovin použit v savcích buňkách, nebo v translačním systému žabích oocytů z mRNA, jež byly transkribovány *in vitro*. Jednotka exprese pHZ-1 zahrnuje promotor myšího metalothioneinu-1, promotor bakteriofága T7 s přilehlými mnohočetnými klonovacími okraji,

obsahujícími unikátní restrikční místa pro inzerci kódujících sekvencí, terminátor lidského růstového hormonu a terminátor bakteriofága T7. Navíc pHZ-1 obsahuje *E. coli* počátek replikace, bakteriální beta-laktamasový gen, jednotku exprese savčího selekční markeru, zahrnující SV40 promotor a počátek replikace, a gen resistance k neomycinu a SV40 transkripční terminátor. Pro zajištění jednosměrného klonování do pHZ-1 byla použita polymerasová řetězová reakce s patřičnými primery k vytvoření *Eco* RI místa resp. *Xho* I místa, před kodonem translační iniciace resp. za translačním terminačním kodonem. Polymerasová řetězová reakce se prováděla ve směsi obsahující 10  $\mu$ l 10x ULTMA™ DNA polymerasového pufru (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), 6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ l roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 2,5  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l roztoku primeru ZC6603 (GAGGAATTTCG CAGAAGCCAT GCCCTCTTGG GCCCTCTTCA TGGTC), 2,5  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l roztoku primeru ZC5762 (AGAGAGAGAG AGAGCTCGAG TCAAGGCTGC TGCCAATAGC TTAGTGGTAG GT), 32,8  $\mu$ l vody, 1  $\mu$ l kultury bakterií ranně logaritmické fáze, obsahujících plasmid myšího MPL receptoru buď typu I nebo typu II a 1  $\mu$ l 6U/ $\mu$ l DNA polymerasy (ULTMA™ polymerasa; Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). V reakci byl použit AmpliWax™ (Roche Molecular Systems, Inc.) podle instrukcí dodavatele. Polymerasová řetězová reakce byla nechána běžet po 25 cyklů (1 minuta při 95°C, 1 minuta při 55°C, a 3 minuty při 72°C), s následující 10 minutovou inkubací při 72°C. Amplifikované produkty byly seriálně extrahovány fenol/chloroformem a chloroformem a sraženy ethanolem v přítomnosti 6  $\mu$ g glykogenového nosiče a 2,5 M octanu amonného. Pelety byly resuspendovány v 87  $\mu$ l vody do níž se přidalo 10  $\mu$ l 10 x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.), 2  $\mu$ l 10 U/ $\mu$ l *Eco* RI (Boehringer Mannheim) a 1  $\mu$ l 40 U/ $\mu$ l *Xho* I (Boehringer Mannheim Corp.). Digesce se prováděla 1 hodinu při 37°C. Reakce byla ukončena zahřátím na 65°C po 15 minut a chromatografována přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (CHROMA SPIN + TE400™; Clontech Laboratories Inc.).

Izolované receptorové inzerty popsané shora byly ligovány do *Eco* RI a *Xho* I digerovaného a defosforylovaného vektoru pHZ-1. Ligační reakce obsahovala 1  $\mu$ l 50 ng/ $\mu$ l upraveného pHZ-1 vektoru, 5  $\mu$ l 5 ng/ $\mu$ l cDNA inzertu, 2  $\mu$ l 10x ligasového pufru (Promega

Corp.), 11,75  $\mu$ l vody a 0,25  $\mu$ l 4 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA ligasy (Stratagene Cloning Systems). Ligace se prováděla při 10°C přes noc. Ligované DNA byly transfekovány do *E. coli* (MAX EFFICIENCY DH108<sup>TM</sup> kompetentní buňky; GIBCO BRL) v souladu s výrobcovými instrukcemi. Platnost inzertů myšího *MPL* receptoru typu I a typu II a lidského *MPL-P* receptoru v pHZ-1 byla potvrzena sekvenováním DNA. Výsledné plasmidy pSLmpl-8 resp. pSLmpl-9 nesly cDNA myšího *MPL* receptoru typu I resp. typu II. Plasmid pSLmpl-44 nesl inzert cDNA lidského *MPL-P* receptoru.

### Příklad 3

#### Konstrukce BaF3 buněčných linií exprimujících *MPL* receptory

BaF3, pre-lymfoidní, na interleukinu-3 závislá buněčná linie, odvozená z myší kostní dřeně (Palacios a Steinmetz, *Cell* 41:727-734, 1985; Methey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986) byla udržována v kompletním médiu (RPMI 1640 médium; JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), doplněném 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra, 4 % kondicionovaného média z kultivovaných WEHI-3 buněk (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), 2 mM glutaminem, 2-merkapt ethanol (finální konc. 1 : 280 000) a PSN antibiotiky (GIBCO BRL). Před elektroporací do buněk BaF3 byly plasmidy pSLmpl-8, pSLmpl-9 a pSLmpl-44, purifikované s cesium chloridem, linearizovány v místě *Nde* I. Buňky BaF3 byly pro elektroporaci promyty jednou v RPMI 1640 médiu a resuspendovány v RPMI 1640 médiu na hustotu 10<sup>7</sup> buněk/ml. Po jednom ml resuspendovaných buněk BaF3 bylo smícháno s 30  $\mu$ g DNA každého z linearizovaných plasmidů a směsi byly přeneseny do oddělených jednorázových elektroporačních komůrek (GIBCO BRL). Po asi 15 minutové inkubaci za pokojové teploty dostaly buňky sérii dvou šoků (800  $\mu$ Fad/300 V., 1180  $\mu$ Fad/300 V.) dodaných elektroporačním přístrojem (CELL-PORATOR<sup>TM</sup>; GIBCO BRL). Po 5 minutách času na vzpamatování byly elektroporované buňky přeneseny do 10 ml kompletního média a umístěny na 15 - 24 hodin do inkubátoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Buňky pak byly stočeny a resuspendovány v 10 ml kompletního média obsahujícího 1600  $\mu$ g/ml G418 a naneseny při limitujících ředěních na

96-jamkové destičky pro tkáňové kultury k izolaci G418-resistentních klonů. Na expresi MPL receptorů v G418-resistentních BaF3 klonech se usuzovalo podle "Northernovy" analýzy přítomnosti MPL receptorových transkriptů v BaF3 mRNA. U buněčné linie označené BaF3/MPLR1.1 byla nalezena vysoká hladina exprese mRNA myšního MPL receptoru typu I a tato linie byla používána pro následné testy s MPL ligandovou aktivitou v kondicionovaných médiích transfekovaných buněk BHK 570. Buněčná linie exprimující mRNA receptoru typu II byla označena BaF3/MPLR2.

#### Příklad 4

##### Produkce rozpustného myšního MPL receptoru

Savčí plasmid exprese kódující rozpustný myší MPL receptor typu I (pLDmp1-53) byl vytvořen spojením segmentu DNA z pSLmp1-9, savčího plasmidu exprese, obsahujícího cDNA kódující myší MPL receptor typu I, jak je popsána výše a plné délky, se segmentem DNA z pSLmp1-25, plasmidu exprese konstruovaného k produkci rozpustného myšního MPL receptoru typu I v bakteriích.

cDNA segment kódující rozpustný myší MPL receptor typu I byl izolován PCR s použitím primerů ZC6704 (GAAGAGGAAT TCACCATGGA TGTCTTCTTG CTGGCCTTGG GCACAGAG) a ZC6703 (CGACTTTACC TCGAGTGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC) a jako templátu plasmidu pSLmp1-9 s receptorem plné délky. Pro zajištění jednosměrného klonování byla do primerů ZC6704 resp. ZC6703 v jejich 5' koncích zahrnuta restriční místa *Eco* RI resp. *Xho* I. Primer ZC6703 také kódoval ve správném čtecím rámci "konsensus" cílovou sekvenci protein kinasy k umožnění *in vitro* značení purifikovaného rozpustného receptoru  $^{32}\text{P}$ -ATP (Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 558-562, 1989). PCR se prováděla ve směsi obsahující 10  $\mu\text{l}$  10x ULTMA<sup>TM</sup> DNA polymerasového pufuru (Roche Molecular Systems, Inc.), 6  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{l}$  roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 11  $\mu\text{l}$  4,55 pmol/ $\mu\text{l}$  roztoku primeru ZC6704 (GAAGAGGAAT TCACCATGGA TGTCTTCTTG CTGGCCTTGG GCACAGAG), 21  $\mu\text{l}$  2,43 pmol/ $\mu\text{l}$  roztoku primeru

ZC6703 (CGACTTTACC TCGAGTGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC), 50,3  $\mu$ l vody, 1  $\mu$ l 50 ng/ $\mu$ l pSLmpl-9 digерованého *Hind* III a *Xba* I, a 1  $\mu$ l 6U/ $\mu$ l ULTMA<sup>TM</sup> DNA polymerasy (Roche Molecular Systems, Inc.). V reakci byl použit AmpliWax<sup>TM</sup> (Roche Molecular Systems, Inc.) podle instrukcí dodavatele. Polymerasová řetězová reakce byla nechána běžet po 3 cykly (1 minuta při 95°C, 1 minuta při 50°C, a 2 minuty při 72°C), s následujícími 11 cykly při zvýšené "stringenci" hybridizace (1 minuta při 95°C, 30 sekund při 55°C, a 2 minuty při 72°C), s následující 10 minutovou inkubací při 72°C. Amplifikované produkty byly seriálně extrahovány fenol/chloroformem a chloroformem, s následnou chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc.). PCR produkt byl sražen ethanolem v přítomnosti 20  $\mu$ g glykogenového nosiče a 2,5 M octanu amonného. Peleta byla resuspendována v 32  $\mu$ l vody. K 16  $\mu$ l resuspendovaného PCR produktu se přidaly 2  $\mu$ l 10 x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.), 1  $\mu$ l 10 U/ $\mu$ l *Eco* RI (Boehringer Mannheim) a 1  $\mu$ l 40 U/ $\mu$ l *Xho* I (Boehringer Mannheim Corp.). Digesce se prováděla 1 hodinu při 37°C. Digesce byla ukončena zahřátím na 65°C po 15 minut a produkt byl purifikován na 0,7 % gelu nízkotající agarosy. Získání fragmentu z nízkotající agarosy se provedlo digescí gelové matrice  $\beta$ -agarasou (New England Biolabs).

Výsledný PCR produkt kódoval N-koncovou extracelulární doménu myšního MPL receptoru typu I (zbytky 27 až 480 Vzorce VI). V nepřítomnosti putativní receptorové transmembránové domény (zbytky 483 až 504 Vzorce VI) se očekává, že exprimovaná bílkovina bude v přítomnosti vhodného signálního peptidu secernována. Myší cDNA kódující rozpustný MPL receptor typu II byla získána s použitím PCR podmínek popsaných shora až na to, že jako templát byl použit pSLmpl-8. Platnost obou fragmentů receptorů byla potvrzena sekvenováním DNA.

Fragmenty DNA kódující myší rozpustné MPL receptory typu I a typu II byly klonovány do *Eco* RI a *Xho* I digерованého vektoru pOmpA2-5 za vzniku pSLmpl-26 respektive pSLmpl-27. Plasmid pOmpA2-5 je modifikace pOmpA2 (Ghrayab et al., *EMBO J.* 3:2437-2442, 1984), bakteriálního vektoru exprese navrženého ke směrování rekombinantní bílkoviny do periplazmatického prostoru. pOmpA2-5 byl zkonstruován náhradou 13 bp sekvence mezi *Eco* RI

a *Bam* HI místy pOmpA2 syntetickou 42 bp sekvencí. Sekvence byla vytvořena hybridizací dvou 42 nukleotidových komplementárních oligonukleotidů (ZC6707, AATTCGCCAT GGGACTCGAG CATCACCATC ACCATCACTG AG; a ZC6706, GATCCTCAGT GATGGTGATG GTGATGCTCG AGTCCCATGG CG), které při zpárování bází vytvořily *Eco* RI a *Bam* HI lepicí konce, což zjišťovalo jednosměrné klonování do *Eco* RI a *Bam* HI digerovaného pOmpA2. Uvnitř vložené sekvence je *Xho* I místo ve stejném čtecím rámci jako bakteriální zaváděcí sekvence a kódující cDNA myšního rozpustného MPL receptoru, jakož i úsek šesti histidinových kodonů ve stejném rámci, lokalizovaný 3' od *Xho* I místa, k umožnění purifikace rekombinantní bílkoviny pomocí kovově-chelatační afinitní chromatografie (Houchuli et al., *Bio/Technology* 6:1321-1325, 1988). Za sekvencí kódující histidinový úsek následoval terminační kodon ve stejném rámci. Platnost pOmpA2-5, pSLmpl-26 a pSLmpl-27 byla ověřena sekvenováním DNA.

pLDmpl-53, savčí vektor exprese, produkující myší rozpustný MPL receptor typu I, byl zkonstruován spojením segmentů pSLmpl-9 a pSLmpl-26 do vektoru exprese pHZ-200 (pHZ-1, v němž je gen neomycinové resistance nahrazen dihydrofolát reduktasovou sekvencí). 1164 bp *Eco* RI/*Bam* HI cDNA fragment z pSLmpl-9 nahradil savčí signální sekvenci deletovanou během konstrukce bakteriálního plasmidu exprese pSLmpl-26. 416 bp *Bam* HI fragment z pSLmpl-26 dodal kódující sekvenci pro karboxy-koncovou část rozpustného MPL receptoru, doménu pro značení kinasou, poly-histidinový úsek a translační terminátor. Tyto dva fragmenty byly purifikovány na gelu a klonovány do *Eco* RI/*Bam* HI míst pBluescript<sup>R</sup> KS+ (Stratagene Cloning Systems) za vzniku plasmidu pBS8.76LD-5. Správná orientace 416 bp *Bam* HI fragmentu, odvozeného od pSLmpl-26, vzhledem k 1164 bp *Eco* RI/*Bam* HI fragmentu, odvozenému od pSLmpl-9, byla v pBS8.76LD-5 stanovena pomocí PCR s použitím primerů ZC6603 (GAGGAATTCG CAGAAGCCAT GCCCTCTTG GCCCTCTTCA TGGTC) a ZC6703 (CGACTTTACC TCGAGTGCTA CTGATGCTCT TCTGCCAGCA GTCTCGGAGC CCGTGGACAC). Místo *Xba* I uvnitř poly-spojkové sekvence pBS8.76LD-5 umožňovalo vynětí rekonstituované receptorové cDNA jako 1,5 kb *Eco* RI/*Xba* I fragmentu ke klonování do pHZ-200 po digesci tohoto vektoru s *Eco* RI a *Xba* I. Výsledný savčí plasmid exprese, pLDmpl-53, byl připraven ve velkém měřítku pro transfekci do buněk BHK.

Dvacet mikrogramů purifikovaného plasmidu pLDmp1-53 bylo transfekováno do buněk BHK 570 s použitím kalcium fosfátové precipitační metody. Po pěti hodinách dostaly buňky šok s 15 % glycerolem po 3 minuty k usnadnění záchytu DNA. Čerstvé růstové médium bylo přidáno přes noc. Následující den byly buňky rozděleny do různých ředění a bylo přidáno selekční médium obsahující 1  $\mu$ M methotrexát. Přibližně po dvou týdnech byly viditelné jednotlivé methotrexát-resistentní kolonie. Resistentní kolonie byly buď spojeny, anebo udržovány jako oddělené klony. Použitá média ze spojených kolonií byla okamžitě testována na přítomnost rozpustné bílkoviny MPL receptoru.

Rozpustná bílkovina MPL receptoru byla izolována prostřednictvím interakce poly-histidinového úseku, přítomného v karboxy-konci bílkoviny, s kovově-chelatační pryskyřicí obsahující imobilizovaný  $\text{Ni}^{2+}$  (HIS-BIND<sup>TM</sup>; Novagen, Madison, WI). Bezserové kultivační médium použité u spojených kolonií pLDmp1-53 bylo necháno protéct přes tuto pryskyřici a navázaná bílkovina byla eluována 1 M imidazolem. SDS-PAGE analýza ukázala jediný pruh při -67 kDa. Tato bílkovina byla podrobena analýze N-koncových aminokyselin a byla potvrzena jako myší MPL receptor.

Rozpustná bílkovina MPL receptoru byla purifikována ze spojených BHK transfektantů, jež byly transfekovány plasmidem pLDmp1-53, exprimujícím myší rozpustný MPL receptor typu I. Tento purifikovaný rozpustný receptor byl imobilizován na matici CNBr-aktivované SEPHAROSE<sup>TM</sup> 4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.) v podstatě jak je doporučováno výrobcem a použit k purifikaci MPL aktivity v kondicionovaných médiích buněk 24-11-5. Afinitní matrice byla naložena do kolony XK16 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.). Kondicionované médium z buněk 24-11-5 bylo zkoncentrováno na membráně dutých vláken s mezí 10 kDa (A/G Technology Corp., Needham, MA) a nanášeno zdola na MPL receptorovou afinitní kolonu při průtoku 1 ml/min. Kolona byla promyta solným roztokem pufovaným fosfátem (PBS), obsahujícím 0,5 M NaCl a 0,01 % azidu sodného. MPL aktivita byla z kolony eluována 3 M thiokyanátem draselným (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) při průtoku 0,5 ml/min. Thiokyanát draselný byl odstraněn dialýzou proti PBS. Aktivní frakce byly identifikovány pomocí MTT proliferačního testu (popsáno v Příkladu 7).

## Příklad 5

Izolace a charakterizace buněčné linie exprimující ligand MPL receptoru.

Buňky BaF3/MPLR1.1 jsou IL-3 dependentní buňky, exprimující stabilně transfekovaný myší MPL receptor typu I. Byla rozplánována mutagenese a selekční schéma pro izolaci buněčných linií exprimujících ligand MPL receptoru za použití mutagenese buněk BaF3/MPLR1.1 a selekce na autokrinní růst v nepřítomnosti exogenního IL-3.

Přibližně  $1,2 \times 10^6$  buněk BaF3/MPLR1.1 bylo peletováno a promyto GM (RPMI 1640 médium doplněné 2-merkaptoethanolem (finální konc. 1 : 280 000), 2 mM L-glutaminem, 110  $\mu\text{g/ml}$  pyruvátu sodného, 50  $\mu\text{g/ml}$  G418 a 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra. Buňky byly resuspendovány v 2 ml GM obsahujícího 0,15 % (obj./obj.) mutagenu 2-ethylmethansulfonátu (EMS) a inkubovány po 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci byly buňky promyty jednou v PBS a jednou v GM a nanášeny na 10 cm misky při hustotě asi 40 000 buněk/ml v GM doplněném 5 % kondicionovaného média WEHI-3 buněk (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) jako zdroje IL-3. Před selekcí na růst nezávislý na IL-3 byly buňkám ponecháno k nápravě období sedmi dní inkubace při 37°C pod 5 % CO<sub>2</sub>. Po tomto období byla v kultuře husté životaschopné buňky. Buňky byly promyty GM a kultivovány v GM bez WEHI-3 kondicionovaného média. Po jedenácti dnech selekce byl pozorován malý počet životaschopných buněk. Hustota životaschopných buněk na IL-3 nezávislé kultury byla odhadnuta na 250 buněk/ml. Po jednom ml na IL-3 nezávislé kultury bylo nanášeno do 19 jamek 24-jamkové kultivační destičky k další charakterizaci.

Kondicionovaná média ze shora popsaného růstu buněk BaF3/MPLR1.1 nezávislého na IL-3 byla testována na proliferační aktivitu k buňkám BaF3/MPLR. U kondicionovaných médií ze všech 19 vzorků [pools] nezávislých co do růstu na IL-3 bylo nalezeno, že mají aktivitu v MTT proliferačním testu (popsaném v Příkladu 7). Pozitivní média byla dále testována na proliferační aktivitu v přítomnosti 2  $\mu\text{g/ml}$  potkaních protilátek proti myšimu IL3, myšimu IL-4 nebo v přítomnosti obou neutralizujících protilátek (Pharmigen, San Diego, CA)



k identifikaci mutantů, jejichž růst byl nezávislý na IL-3 a jež exprimovaly tyto cytokiny. (V předcházejícím experimentu bylo nalezeno, že buňky BaF3 odpovídaly také na IL-4). Pouze u kondicionovaného média z buněk z destičky č. 11 (označených jako buňky "24-11") bylo nalezeno, že má aktivitu, jež nebyla neutralizována protilátkami k IL-3 nebo IL-4.

Mutagenizační a selekční schéma popsané shora se aplikovalo na pět dalších BaF3/MPLR klonů (BaF3/MPLR1 klony č. 4, 9, 12, 15 resp. 18, označované jako BaF3/MPLR1.4, .9, .12, .15 resp. .18). U sedmnácti izolátů bylo zjištěno, že mají kondicionovaná média, která stimulují proliferaci BaF3/MPLR1 buněk. U aktivity všech těchto médií bylo nalezeno, že je neutralizována protilátkami k IL-3 nebo IL-4, jednotlivě nebo v kombinaci. Tyto klony nebyly dále charakterizovány.

Proliferační aktivita kondicionovaných médií ze vzorku 24-11 byla podrobně charakterizována. Vzorek [pool] 24-11 byl rozdělen na devatenáct menších vzorků [subpools] a kondicionovaná média byla re-testována na aktivitu. Všech devatenáct menších vzorků (t.j. 24-11-1 až 24-11-19) stimulovalo v nepřítomnosti exogenního IL-3 proliferaci buněk BaF3/MPLR1, růstově závislých na IL-3. Tato aktivita nebyla inhibována neutralizujícími protilátkami IL-3 nebo IL-4, nebo kombinací obou těchto protilátek.

Ke stanovení specifity 24-11 aktivity se provedly dva pokusy. Kondicionovaná média byla testována na proliferační aktivitu na kontrolních BaF3 buňkách, které neexprimují MPL receptor. V nepřítomnosti exogenního IL-3 nebyla proliferace kontrolních BaF3 buněk pozorována s žádným z kondicionovaných médií z devatenácti menších vzorků 24-11. V druhém pokusu byla proliferační aktivita testována na inhibici rozpustným MPL receptorem. Buňky BaF3/MPLR1 byly kultivovány v GM doplněném 50 % kondicionovaného média 24-11. Ke vzorkům byl přidáván myší rozpustný MPL receptor typu I na konečnou koncentraci 0,0; 0,625; 1,25; 2,5 nebo 5,0  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky byly odečítány MTT testem buněčné proliferace po 4 dnech. Proliferační aktivita kondicionovaného média 24-11 byla úplně blokována při 0,625 až 1,25  $\mu\text{g/ml}$  rozpustného MPL receptoru. Koncentrace rozpustného receptoru, které úplně inhibovaly aktivitu, neměly žádný vliv na IL-3 nebo IL-4 stimulaci BaF3/MPLR1 buněk. Tyto výsledky ukázaly, že rozpustný MPL receptor kompetuje o stimulační aktivitu

24-11 médií a byly v souladu s hypotézou, že buňky 24-11 exprimují ligand MPL receptoru.

Klony odvozené od buněk 24-11 byly izolovány nanesením limitujících ředění. Jeden klon, označený 24-11-5 #3, vykazoval ve svých kondicionovaných médiích vysokou hladinu proliferační aktivity v relaci k celkovému vzorku 24-11. Pro proliferační aktivitu bylo nalezeno, že je stejná jako u ředění 1:2000 kondicionovaného média z WEHI-3 buněk (Becton Dickinson Labware).

#### Příklad 6

##### Konstrukce knihovny cDNA 24-11-5 #3

Celková RNA se připravila z  $-2,7 \times 10^8$  buněk 24-11-5 #3 s použitím guanidin isothiokyanátu s následnou CsCl centrifugací (Chirgwin et al., *ibid*). poly(A)<sup>+</sup> RNA byla izolována s použitím izolační soupravy OLIGOTEX-dT-mRNA (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) podle výrobcových instrukcí.

První vlákno cDNA z 24-11-5 #3 buněk se syntetizovalo ve 4 oddělených paralelních reakcích. Každá reakce obsahovala 7  $\mu$ l poly d(T)-selektované poly(A)<sup>+</sup> RNA 24-11-5 #3 o koncentraci 1,6  $\mu$ g/ $\mu$ l a 2,5  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l roztoku primeru prvního vlákna ZC6172 (GTCGGTGCTC AGCATTCACT ACTCGAGGGT TTTTTTTTTT TTTTTT), obsahujícího restrikční místo Xho I. Směs byla zahřívána na 65°C po 4 minuty a ochlazená chlazením na ledu. Syntéza prvního vlákna cDNA byla spuštěna přidáním 8  $\mu$ l pufru prvního vlákna (5x SUPERSRIPT<sup>TM</sup> pufr; GIBCO BRL), 4  $\mu$ l 100 mM dithiothreitolu a 2  $\mu$ l roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a 5-methyl-dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) ke směsi RNA-primer. Reakční směs byla inkubována při 45°C po 4 minuty s následným přidáním 10  $\mu$ l 200 U/ $\mu$ l roztoku RNasy H<sup>-</sup> reversní transkriptasy (GIBCO BRL). Účinnost syntézy prvního vlákna byla analyzována v paralelní reakci přidáním 10  $\mu$ Ci <sup>32</sup>P- $\alpha$ dCTP k 10  $\mu$ l alikvotu jedné z reakčních směsí ke značení reakce pro analýzu. Reakce byly inkubovány při 45°C po 1 hodinu s následnou inkubací při 50°C po 15 minut. Neinkorporovaný <sup>32</sup>P- $\alpha$ dCTP ve značené reakci byl odstraněn chromatografií přes

gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc.). Neznačené reakce pro tvorbu prvního vlákna byly spojeny a neinkorporované nukleotidy v reakci neznačeného prvního vlákna byly odstraněny dvojnásobným srážením cDNA v přítomnosti 32 µg glykogenového nosiče, 2,5 M octanu amonného a 2,5 objemu ethanolu. Neznačená cDNA byla resuspendována ve 144 µl vody pro použití v syntéze druhého vlákna. Délka značeného prvního vlákna cDNA byla stanovena elektroforézou v agarosovém gelu.

Syntéza druhého vlákna byla prováděna na prvním vlákně cDNA za podmínek, jež podporují startování syntézy druhého vlákna prvním vláknem s výslednou tvorbou DNA smyček. Provedly se tři oddělené paralelní reakce pro druhého vlákna. Každá reakce pro druhé vlákno obsahovala 48 µl cDNA neznačeného prvního vlákna, 16,5 µl vody, 20 µl 5x pufru pro polymerasu I (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 µl 100 mM dithiothreitolu, 2 µl roztoku obsahujícího po 10 mM koncentraci všech deoxynukleotid trifosfátů, 3 µl 5 mM roztoku β-NAD, 15 µl 3 U/µl roztoku *E. coli* DNA ligasy (New England Biolabs, Inc.) a 5 µl 10 U/µl roztoku *E. coli* DNA polymerasy I (Amersham Corp.). Reakce byla sestavována při pokojové teplotě a byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě s následujícím přidáním 1,5 µl 2U/µl roztoku RNasy H (GIBCO BRL). K monitorování účinnosti syntézy druhého vlákna byl 10 µl alikvot z jedné směsi pro syntézu druhého vlákna značen 10 µCi <sup>32</sup>P-αdCTP. Reakce byly inkubovány při 15°C po dvě hodiny s následnou inkubací 15 minut při pokojové teplotě. Neinkorporovaný <sup>32</sup>P-αdCTP ve značené reakci byl před analýzou pomocí elektroforézy v agarosovém gelu odstraněn chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories). Neznačené reakce byly spojeny a extrahovány fenol/chloroformem a chloroformem, s následnou ethanolovou precipitací v přítomnosti 2,5 M octanu amonného.

Jednovláknová DNA ve struktuře smyčky byla štěpena s použitím rostlinné ("mung bean") nukleasy. Reakční směs obsahovala 100 µl cDNA druhého vlákna, 20 µl 10x nukleasového pufru (Stratagene Cloning Systems), 16 µl 100 mM dithiothreitolu, 48 µl vody a 10 µl ředícího "mung bean" nukleasového pufru (Stratagene Cloning Systems), a 6 µl 50 U/µl "mung bean" nukleasy (Promega Corp.). Reakce byla inkubována při 37°C po 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 20 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0,

s následnou postupnou extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora. Po extrakci byla DNA sražena v ethanolu a resuspendována ve vodě.

V resuspendované cDNA byly zatupeny konce T4 DNA polymerasou. cDNA, která byla resuspendovaná ve 188  $\mu$ l vody, byla smíchána s 50  $\mu$ l 5x T4 DNA polymerasového pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>), 3  $\mu$ l 0,1 M dithiothreitolu, 4  $\mu$ l roztoku obsahujícího po 10 mM koncentraci všech deoxynukleotid trifosfátů, 5  $\mu$ l 1 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA polymerasy (Boehringer Mannheim Corp.). Po inkubaci po 30 minut při 15°C byla reakce ukončena přidáním 10  $\mu$ l 0,5 M EDTA, s následnou seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora. DNA byla chromatografována přes gelové-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc.) k odstranění stopových množství bílkovin a k odstranění krátkých cDNA o délce méně než -400 bp. cDNA byla sražena ethanolem v přítomnosti 10  $\mu$ g glykogenového nosiče a 2,5 M octanu amonného, a byla resuspendována v 15  $\mu$ l vody. Na základě inkorporace <sup>32</sup>P- $\alpha$ dCTP byl výtěžek cDNA určen jako -8  $\mu$ g z počátečních 40  $\mu$ g mRNA templátu.

Na 5' konce cDNA popsané shora byly zaligovány *Eco* RI adaptory pro umožnění klonování do vektoru exprese. 10  $\mu$ l alikvot cDNA (-5  $\mu$ g) a 21  $\mu$ l 65 pmol/ $\mu$ l roztoku *Eco* RI adaptoru (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) bylo smícháno s 4  $\mu$ l 10x ligasového pufru (Promega Corp.), 3  $\mu$ l 10 mM ATP a 3  $\mu$ l 15 U/ $\mu$ l roztoku T4 DNA ligasy (Promega Corp.). Reakce byla inkubována přes noc (-48 hodin) při 9°C. Reakce byla ukončena přidáním 140  $\mu$ l vody a 20  $\mu$ l 10x H pufru (Boehringer Mannheim Corp.) a inkubací při 65°C po 40 minut. Po inkubaci byla cDNA extrahována fenol/chloroformem a chloroformem, jak je popsáno shora a precipitována v přítomnosti 2,5 M octanu amonného a 1,2 objemu isopropanolu. Po centrifugaci byla cDNA peleta myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 89  $\mu$ l vody.

K zajištění jednosměrného klonování této cDNA do vektoru exprese byla tato cDNA digerována *Xho* I, což dalo cDNA mající 5' *Eco* RI lepidlý konec a 3' *Xho* I lepidlý konec. Restriční místo *Xho* I na 3' konci cDNA bylo dříve zavedeno s primerem ZC6172 (GAGCACAGAA TTCACTACTC GAGGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT). Digesce

restrikčním enzymem byla prováděna v reakci obsahující 89  $\mu$ l cDNA popsané shora, 10  $\mu$ l 10x H puftru (Promega Corp.) a 1.5  $\mu$ l 40 U/ $\mu$ l Xho I (Boehringer Mannheim Corp.). Reakce byla ukončena seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem a chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc.).

cDNA byla sražena ethanolem, myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 20  $\mu$ l 1x nakládacího gelového puftru (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % glycerol a 0,125 % bromfenolová modř). Resuspendovaná cDNA byla zahržata na 65°C po 5 minut, ochlazená na ledu a podrobena elektroforéze na 0,8 % gelu nízkotající agarosy (SEA PLAQUE GTG<sup>TM</sup> nízkotající agarosa, FMC Corp.). Kontaminující adaptory a cDNA pod délkou 0,5 Kb byly vyříznuty z gelu. Elektrody byly přehozeny a cDNA byla podrobena elektroforéze dokud se nezkoncentrovala blízko počátku dráhy. Oblast obsahující zkoncentrovanou cDNA byla vyříznuta a dána do mikrocentrifugační zkumavky a byl stanoven přibližný objem řezu gelu. Do zkumavky byl přidán alikvot vody, přibližně trojnásobného objemu řezu gelu (300  $\mu$ l), a agarosa byla roztavena zahržatím na 65°C po 15 minut. Po ekvilibraci vzorku na 42°C, bylo přidáno 5  $\mu$ l 1U/ $\mu$ l  $\beta$ -agarasy (New England Biolabs, Inc.) a směs byla inkubována 90 minut při 45°C k digesci agarosy. Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 40  $\mu$ l 3 M octanu sodného a směs byla inkubována na ledu po 15 minut. Vzorek byl centrifugován při 14 000 x g po 15 minut za pokojové teploty k odstranění nezdigerované agarosy, s následnou chromatografií přes gelově-filtrační kolonu s velikostí pórů 400 (Clontech Laboratories Inc.). cDNA byla sražena ethanolem, myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována v 70  $\mu$ l vody na kinasovou reakci k fosforylaci zaligovaných Eco RI adaptorů.

K 70  $\mu$ l roztoku cDNA se přidalo 10  $\mu$ l 10x ligasového puftru (Stratagene Cloning Systems) a směs byla zahřívána na 65°C po 5 minut. Směs byla ochlazená na ledu a přidalo se 16  $\mu$ l 10 mM ATP a 4  $\mu$ l 10 U/ $\mu$ l T4 polynukleotid kinasy (Stratagene Cloning Systems). Reakce byla inkubována při 37°C po 1 hodinu a ukončena zahržíváním na 65°C po 10 minut s následující seriální extrakcí fenol/chloroformem a chloroformem. Fosforylovaná cDNA byla sražena ethanolem v přítomnosti 2,5 M octanu amonného, myta 70 %-ním ethanolem, usušena na vzduchu a resuspendována

v 10  $\mu$ l vody. Koncentrace fosforylované cDNA byla stanovena na -40 fmol/ $\mu$ l.

Savčí vektor exprese pDX (zveřejněný v US patentu č. 4 959 318) /Obrázek) byl modifikován pro zavedení 24-11-5 #3 cDNA, jež byla syntetizována s *Eco* RI a *Xho* I konci. Endogenní *Sal* I místo na pDX bylo zrušeno digescí plasmidu a *Sal* I a recirkularizací, jež následovala po zatupení kohezivních konců *Sal* I T4 DNA polymerasou. Recirkulovaný plasmid byl digеровán *Eco* RI a byla k němu zaligována krátká sekvence poly-spojky, sestávající ze dvou komplementárních oligonukleotidů, ZC6936 (AATTGGCGGC CGCGTCGACT CGTGGATG) a ZC6937 (AATTCATCCA CGAGTCGACG CGGCCGCC) za vzniku plasmidu pDX.ES. Zavedená sekvence poly-spojky na pDX.ES obsahovala *Eco* RI a *Sal* I místa k zajištění jednosměrného klonování 24-11-5 cDNA, syntetizované s *Eco* RI a *Xho* I konci.

Plasmidová cDNA knihovna byla připravena ligací *Eco* RI-*Xho* I 24-11-5 cDNA do *Eco* RI/*Sal* I digерованého pDX.ES. Ligační směs byla elektroporována do *E. coli* (kompetentní buňky ELEKTROMAX<sup>TM</sup> DH10B<sup>TM</sup>; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), s použitím pulzačního přístroje 0,2 cm kyvety (gene pulser/pulse controller, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) s nastavením 0,2 KV, 400 ohm a 25  $\mu$ FAD. Buňky byly zředěny v 1,5 ml Luriový pŮdy a inkubovány při 37°C po 45 minut, s následujícím přidáním 0,75 ml 50 % glycerolu. Transfekované buňky byly rozalikvotovány a skladovány při -70°C do doby použití. Z osmdesáti fmolů cDNA vzniklo více než 700 000 nezávislých rekombinantních plasmidů.

#### Příklad 7

##### Hodnocení exprese v 24-11-5 cDNA knihovně na MPL aktivitu

24-11-5 #3 cDNA knihovna byla nanášena na přibližně dva tisíce misek o průměru 10 cm s Luriovým živným agarem, doplněným 100  $\mu$ g/ml ampicilinu. Hustota nanášení byla mezi 200 a 250 bakteriálními koloniemi na misky. Plasmidová DNA pro transfekci do buněk BHK 570 se připravila z každé bakteriální misky s použitím DNA purifikační pryskyřice MAGIC MINIPREPS<sup>TM</sup> (Promega

Corp.) podle výrobcových instrukcí. Plasmidové DNA skladovány při -20°C do doby transfekce BHK 570 buněk.

Vzorky [pools] plasmidů 24-11-5 #3 cDNA, každý obsahující přibližně 200 až 250 cDNA klonů, byly transfekovány do buněk BHK 570 s použitím 3 : 1 liposomového přípravku z 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminkarboxyamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoracetátu a dioleylfosfatidylethanolaminu ve vodě (LIPOFECTAMINE™; GIBCO BRL). Dvacet µl 30 ng/ml DNA bylo přidáno k 20 µl 1:10 zředěného roztoku LIPOFECTAMINE™ a inkubováno při pokojové teplotě po 30 minut. Po inkubaci se ke směsi DNA/LIPOFECTAMINE™ přidalo 160 µl bezsérového média (Hams F12: Dulbeccovo NEM (1 : 1), doplněné 2 mM L-glutaminem, 110 µg/ml pyruvátu sodného, 5 µg/ml insulínu, 5 µg/ml fetuínu, 10 µg/ml transferinu, 2 ng/ml kysličníku seleničitého a 25 mM HEPES pufrem) a směs se přenesla do 24 jamkové mikrotitrační destičky obsahující -100 000 buněk BHK 570. Buňky byly inkubovány při 37°C pod 5 % CO<sub>2</sub> po 4 hodiny a potom bylo přidáno 200 µl BHK růstového média (Dulbeccovo modifikované Eaglesovo médium doplněné 2 mM L-glutaminem, 0,11 mg/ml pyruvátu sodného, 5 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra a 100x PSN antibiotiky (GIBCO BRL)). Buňky se inkubovaly po 16 hodin. Média byla odstraněna a nahrazena 0,5 ml čerstvého BHK růstového média, jež se před testováním na MPL aktivitu kondicionovalo po 48 hodin.

K detekci přítomnosti MPL aktivity v kondicionovaných médiích buněk BHK 570 transfekovaných knihovnou se použil test buněčné proliferace. Sto µl kondicionovaného média se přidalo ke 100 µl 10<sup>6</sup>/ml promytých buněk BaF3/MPLR1.1 v RPMT médiu (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) doplněném 2 mM L-glutaminem a PSN antibiotiky (GIBCO BRL), 0,00036 % 2-merkaptoethanolu a 10 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra. Před testováním na proliferaci byly buňky inkubovány po 3 dny při 37°C pod 5 % CO<sub>2</sub>.

Buněčná proliferace v přítomnosti MPL byla kvantifikována s použitím kolorimetrického testu založeného na metabolickém rozkladu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dfenyl tetrazolium bromidu (MTT) (Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, 1983). Dvacet µl 10 mg/ml roztoku MTT (Polyscience, Inc., Warrington, PA) se přidalo k 100 µl testovných buněk BaF3/MPLR1.1 a buňky se

inkubovaly při 37°C. Po 4 hodinách se přidalo 200 µl 0,04 N HCl v isopropanolu, roztok se promíchal a absorbance vzorku se změřila při 570 nM na ELISA čtečce modelu EL320 (Bio-Tek Instruments Inc., Highland Park, VT).

Do buněk BHK 570 byl transfekován jeden vzorek spojených plasmidů [pool], jenž byl shledán pozitivní a označen T1081. Supernatanty těchto transfektantů dávaly pozitivní signál v MTT proliferačním testu. PCR a pokusy s neutralizací protilátkami ukázaly, že tato aktivita nabyla způsobena IL-3 nebo IL-4.

Plasmidy tohoto pozitivního vzorku se použili k transformaci *E. coli* DH10B a buňky se nanosily na misky (42 misek s přibližně 15 - 20 koloniemi na misku, 10 misek s přibližně 90 koloniemi na misku a 8 misek s přibližně 250 koloniemi na misku). Připravily se repliky všech misek a uložily se při 4°C. Kolonie originálních misek se seškrábly a nechaly narůst v tekuté kultuře ještě několik hodin v tekuté kultuře a pak se připravila DNA.

Plasmidová DNA z těchto menších vzorků [sub-pools] byla transfekována do buněk BHK 570 a buněčné supernatanty byly sebrány a testovány jako shora. Po přibližně dvou hodinách byl jeden vzorek (#22) zhodnocen jako pozitivní mikroskopickým prohlížením (prodloužený tvar buněk). O několik hodin později byly dva další vzorky (#19 a #28) také zhodnoceny jako pozitivní. Zbývající supernatanty z každého pozitivního vzorku byly testovány s kontrolními BaF3 buňkami a nebyla u nich shledána žádná aktivita. Navíc: U aktivita z těchto tří pozitivních vzorků bylo nalezeno, že je inhibována rozpustným receptorem typu I.

Misky s replikami ze tří pozitivních vzorků byly ponechány růst po několik hodin, pak byly vypíchnuty jednotlivé kolonie a použity k inokulaci 3-ml kultur. Kultury se rozrůstaly přibližně 8 hodin při 37°C, pak se připravila DNA "miniprepovým" způsobem popsáným shora. Plasmidová DNA byla transfekována do buněk BHK 570 a buněčné byly sebrány přibližně po 10 hodinách a testovány na aktivitu. Jeden klon (označený T1081-19-215 a odpovídající vzorku #19) byl hodnocen po jedné hodině jako pozitivní. Tento klon byl znovu nanosen k získání jednotlivých kolonií. Z dvanácti kolonií byla připravena DNA a transfekována do buněk BHK 570. Všech dvanáct transfektantů bylo později v testu shledáno jako pozitivní. DNA z jedné z dvanácti pozitivních kolonií byla transformována do *E. coli* DHPa. Tento



plasmid byl označen pZGmp1-1081. Tento transformant byl uložen 14. února 1994 u American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, pod přístupovým číslem 69566.

Byla stanovena nukleotidová sekvence cDNA kódující hematopoetickou bílkovinu (thrombopoietin) (Vzorec III). Analýza kódované aminokyselinové sekvence (Vzorec I) ukazovala, že amino-konec maturní bílkoviny je u aminokyselinového zbytku 45. Dva methioninové kodony, v pozicích 105 a 174 ve Vzorcí III se zdají být iniciačními kodony, s hlavním místem iniciace očekávaným v pozici 174.

#### Příklad 8

Hematopoetická aktivita rekombinantního thrombopoietinu.

Z femurů a tibií samicích CD-1 post-pregnantních myší byla vzata dřevina do 25 ml CATCH pufru (99 mg theofylinu, 0,75 g citrátu sodného, 75 mg adenosinu, 20 ml 10x Hankova vyváženého solného roztoku bez  $\text{Ca}^{++}$  a  $\text{Mg}^{++}$  na 200 ml v  $\text{dH}_2\text{O}$ ; pH 7,4). Buňky byly suspendovány na suspenzi jednotlivých buněk pipetováním 25 ml pipetou. Objem byl nastaven CATCH pufrem na 50 ml a buňky byly peletovány při 1000 rpm po 7 minut. Peleta byla resuspendována v 25 ml CATCH pufru a inkubována v T75 láhvích pro tkáňové kultury k prvnímu kolu adheze k plastu po 2 hodiny při 37°C. Neadherované buňky byly sebrány a centrifugovány při 1000 rpm po 7 minut k zpeletování buněk. Peleta byla resuspendována v 15 ml alfa-NEM + 10 % FBS (+ L-glutamin, Na-pyruvát a PSN antibiotika) a inkubována v T75 láhvích pro tkáňové kultury k druhému kolu adheze k plastu jak je popsáno shora pro první kolo. Po finální centrifugaci a resuspendování byly buňky počítány. Jedna polovina buněk o 576 000 buňkách/ml byla nanesena do 24-jamkových kultivačních destiček, spolu se vzorkem média z kontrolních BHK buněk nebo s kondicionovaným médiem z BHK buněk transfekovaných pZGmp1-1081. Po třech dnech inkubace při 37°C byly buňky sebrány a barveny jak se popisuje shora.

Z kontrolní jamky se standardním kondicionovaným médiem se vzalo 150  $\mu\text{l}$  buněk. Z jamek s kondicionovaným médiem z BHK buněk transfekovaných pZGmp1-1081 se bralo 50  $\mu\text{l}$  buněk. Tyto vzorky

byly stočeny a byla připraveny standardní mikroskopické preparáty.

Preparáty byly fixovány v 100 %-ním methanolu, pak omývány 1 : 1 Wrightovým roztokem (0,5 g Wrightova barviva v 300 ml methanolu) / H<sub>2</sub>O po 6 minut, promyty vodou a usušeny. Preparáty byly pak omývány v barvivo Giemsa (Sigma Chemical Corp.) v Sorensenově pufru (2,28 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 2,38 g NaPO<sub>4</sub> v 250 ml H<sub>2</sub>O), myty vodou a usušeny.

Po vztažení na použité objemy, vzorek s médiem BHK/pZGmp1-1081 obsahoval 120 megakaryocytů na 150 μl objem ve srovnání s 9 megakaryocyty na 150 μl objem u kontrolního média. Navíc bylo u megakaryocytů vzorku s experimentálním působením mikroskopicky pozorováno, že jsou rozměrově významně větší a že mají významně vyšší barvení na polynukleární obsah.

Kondicionovaná média z mutantní linie BaF3/MPLR1.1 24-11-5 #3 bylo sebráno a zkoncentrováno 20 krát na filtračním zařízení Amicon Inc. s mezí 10 kDa (Beverly, MA). Vzala se dřev z myších femurů a suspendovala v Iscoveově modifikovaném Dulbeccově médiu (GIBCO BRL) + 15 % fetálního telecího séra (FCS). Po suspendování byly buňky s jádry spočítány a naneseny s 0,9 ml/misku při 75 000 buněk/ml, v médiu nastaveném tak, aby obsahovalo 50 % methylcelulose, 15 % FCS, 10 % BSA a 0,6 % PSN (polotuhé médium), na 1-ml misky pro tkáňové kultury. Přidala se různá kondicionovaná média a kontrolní vzorky tak, aby se celkový objem dostal na 1 ml. Misky se inkubovaly při 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> po 6 dní a pak se prohlížely mikroskopicky ke stanovení počtů kolonií granulocytů/magrofágů (GM). U misek inkubovaných v přítomnosti kondicionovaného média 24-11-5 #3 se pozorovalo, že mají slabou aktivitu podobnou GM-CSF, produkující počet kolonií 25, ve srovnání s nulovým počtem pro vzorek negativní kontroly a počtem 130 pro misku stimulovanou s pozitivní kontrolou (kondicionované médium sleziny stimulované řepkovým mitogenem (PWMSM), připravené inkubací rozdrcené myší sleziny po jeden týden v přítomnosti řepkového mitogenu (získaného od Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) + 2 jednotky/ml erythropoietinu).

Vzala se dřev z myších femurů a suspendovala v Iscoveově modifikovaném Dulbeccově médiu (GIBCO BRL) obsahujícím 15 % FCS a buňky s jádry byly spočítány a naneseny na polotuhé médium jak

je popsáno shora. Tyto buňky se používaly k testování aktivity bílkoviny, kódované inzertem pZGmp1-1081, ve tvorbě kolonií megakaryocytů.

Populace [pool] buněk BHK 570 stabilně transfekovaných pZGmp1-1081 se kultivovala v nepřítomnosti séra, a sbíralo se kondicionované médium. Toto kondicionované médium se testovalo jako takové a v kombinaci s kondicionovaným médiem sleziny a řepkového mitogenu, rekombinantním myším IL-3, IL-6 (Genzyme Corp., Cambridge, MA), IL-11 (Genzyme Corp.) nebo s kombinacemi těchto faktorů. PWMSCM se používalo jako pozitivní kontrola. Jako negativní kontrola se používalo nekondicionované kultivační médium.

Testované nebo kontrolní vzorky se přidávaly ke kulturám dřeně tak, aby nastavily konečný objem na 1 ml. Misky se inkubovaly při 37°C v 5 % CO<sub>2</sub> po 6 dní a pak se prohlížely mikroskopicky ke stanovení počtů kolonií megakaryocytů. Výsledky jsou ukázány v Tabulce 4. Pro souhrn: Kondicionované médium BHK/pZGmp1-1081 vykazovalo aktivitu podporující tvorbu kolonií megakaryocytů, jež byla zesilována v přítomnosti rychle působících faktorů na hladiny značně vyšší než hladiny dosahované s kterýmkoli rychle působícím faktorem samotným.

Tabulka 4

<u>Vzorek</u>	<u>Koloníí megakaryocytů</u>
Negativní kontrola	0
PWMSCM	7
BHK/pZGmp1-1081	2
BHK/pZGmp1-1081 + PWMSCM	15
IL-3	1
IL-3 + BHK/pZGmp1-1081	8
IL-6	0
IL-6 + BHK/pZGmp1-1081	6
IL-11	1
IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	6
IL-3 + IL-6	2
IL-3 + IL-6 + BHK/pZGmp1-1081	9
IL-3 + IL-11	5
IL-3 + IL-11 + BHK/pZGmp1-1081	15

*In vivo* aktivita kondicionovaného média BHK/pZGmp1-1081 byla testována na myších. Bezserové médium bylo sebráno a zkoncentrováno 5 krát filtračního zařízení s mezí 10 kDa (Amicon Inc., Beverly, MA). Kontrolní (nekondicionované) médium bylo zkoncentrováno podobným způsobem. Na šest myší BALB/c (Simonsen Laboratories, Inc., Gilroy, CA) se působilo denně sedmi intraperitoneálními injekcemi 0,5 ml buď kontrolního nebo kondicionovaného média. Vzorky krve byly odebírány ve dnech 0, 3 a 7, a byl v nich spočítán obsah destiček. Výsledky, ukázané v Tabulce 5, předvádějí, že kondicionované médium z buněk BHK/pZGmp1-1081 má trombopoetickou aktivitu.

Tabulka 5

<u>Působení</u>	Počet destiček ( $10^4/\mu\text{l}$ )		
	<u>den 0</u>	<u>den 3</u>	<u>den 7</u>
Kontrola	141	141	87
Kontrola	159	149	184
BHK/pZGmp1-1081	157	160	563
BHK/pZGmp1-1081	169	154	669
BHK/pZGmp1-1081	139	136	492
BHK/pZGmp1-1081	135	187	554

Příklad 9

Izolace lidského thrombopoietinového genu

Amplifikovaná Lambda FIX<sup>R</sup> genomická knihovna lidských plic (Stratagene Cloning Systems) byla probírána k nalezení genu kódujícího lidský thrombopoietin s použitím myší cDNA ligandu *mpl* receptoru jako sondy. Knihovna byla ztitrována a 30 150-mm misek s inokulovanými buňkami *E. coli* kmene LE-392 (Stratagene Cloning Systems) bylo infikováno s  $4 \times 10^4$  jednotek tvorby plaků (PFU). Misky byly inkubovány přes noc při 37°C. Vyzvednutí plaků na filtry se provedlo s použitím HYBOND-N<sup>TM</sup> membrán (Amersham) podle postupu doporučeného výrobcem. Filtry byly zpracovány denaturací v roztoku obsahujícím 1,5 M NaCl a 0,5 M NaOH po 7 minut při pokojové teplotě. Filtry byly krátce odsáty na filtračním papíru k odstranění přebytku denaturačního roztoku, po čemž následovala neutralizace po 5 minut v 1 M Tris-HCl (pH 7,5) a 1,5 M NaCl. Fágová DNA byla fixována na filtry s 1 200  $\mu\text{J}$  UV energie v přístroji STRATALINKER<sup>R</sup> UV crosslinker (Stratagene Cloning Systems). Po fixaci se filtry předmyly třikrát v 0,25 x SSC, 0,25 % SDS a 1 mM EDTA při 65°C. Po předmytí byly filtry prehybridizovány v hybridizačním roztoku (5x SSC, 5x Denhardtův roztok, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA), jenž byl zfiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr. Tepelně denaturovaná DNA lososího spermatu (konečná

koncentrace 100 µg/ml) byla přidána těsně před použitím. DNA filtry se prehybridizovaly přes noc při 65°C.

TPO cDNA plné délky z pZGmp1-1081 byla označena <sup>32</sup>P pomocí startování náhodnými primery s použitím systému MEGAPRIME™ DNA Labelling System (Amersham). Prehybridizační roztok byl odstraněn a nahražen čerstvým hybridizačním roztokem obsahujícím přibližně  $1 \times 10^6$  cpm sondy a hybridizace byla ponechána přes noc při 65°C. Po hybridizaci byl hybridizační roztok odstraněn a každý filtr byl čtyři- nebo pětkrát ponořen do promývacího roztoku obsahujícího 0,25 x SSC, 0,25 % SDS, 1 mM EDTA. Po ponořeních byly filtry promyty osmi po sobě následujícími mytími v promývacím roztoku při 55°C. Po posledním mytí byly filtry exponovány na autoradiografický film (XAR-5; Eastman Kodak Co., Rochester, NY) s intenzifikační fólií po 4 dny při -70°C.

Prohlídka autoradiogramů odhalila několik set míst, jež hybridizovala se značenou sondou. Ze 100 míst byly vypíchnuty agarové válečky a ponořeny do SM obsahujícího 1 % (obj./obj.) chloroformu (Maniatis et al., vyd., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1982). Po inkubaci přes noc byly fágy z každého agarového válečku zředěny 1 : 1 000 v SM. Alikvoty 5 µl byly nanášeny na buňky *E. coli* kmene LE-392. Misky byly inkubovány přes noc při 37°C a vyzvednutí plaků na filtry, prehybridizace, hybridizace, promývání a autoradiografie se provedly jak je popsáno shora.

Prohlídka výsledných autoradiogramů odhalila silné pozitivní signály z dvou primárních izolátů a slabé signály z osmnácti dalších. Z pozitivních oblastí všech dvaceti signálů byly vypíchnuty agarové válečky. Tyto agarové válečky byly zpracovány jak je popsáno shora. Fágy z každého agarového válečku byly zředěny 1 : 100 v SM a alikvoty 1 µl byly nanášeny na buňky *E. coli* kmene LE-392. Misky byly inkubovány, a vyzvednutí plaků a hybridizace se provedly jak je popsáno shora. Filtry se promývaly v promývacím pufru při 55°C. Autoradiogramy těchto filtrů odhalily místa hybridizace odpovídající jednotlivým, odděleným fágovým plakům ze tří původních izolátů, 8-3-2, 10-1-1 a 29-2-1.

Fágové izoláty 8-3-2, 10-1-1 resp. 29-2-1 byly označeny jako λZGmp1-H8, λZGmp1-H10 resp. λZGmp1-H29. DNA z izolátů λZGmp1-H8, λZGmp1-H10 a λZGmp1-H29 byla čištěna s použitím fágového

adsorbentu LAMBDA<sup>TM</sup>SORB (Promega Corp., Madison, WI) podle návodu výrobce. Inzerty lidské genomické DNA ve fágu byly od fágové vektorové DNA separovány digescí *Xba* I a vyčištěny gelovou elektroforézou. Všechny tři fágové izoláty obsahovaly sekvence, které hybridizovaly se sondou myší cDNA ligandu *mpl* receptoru, jak ukázala Southernova analýza (Maniatis et al., *ibid.*). Byl analyzován fág \ZGmpl-H8 a pro hybridizující oblasti \ZGmpl-H8 se našlo, že sídlí ve třech *Xba* I DNA fragmentech o délkách 9,5 kb, 2,5 kb a 1 kb. Fragment 2,5-kb délky byl subklonován do *Xba* I digerovaného fagemidu BLUESCRIPT<sup>R</sup> II SK+ (Stratagene Cloning Systems) za vzniku plasmidu pZGmpl-H82.5.

#### Příklad 10

##### Izolace cDNA lidského thrombopoietinu plné délky

cDNA plné délky, kódující lidský TPO, byla izolována polymerasovou řetězovou reakcí z templátové cDNA lidských jater a ledvin s použitím specifických primerů odvozených od exonových sekvencí identifikovaných v pZGmpl-H82.5 a od konzervované 5' nepřekládané sekvence myší TPO cDNA.

K syntéze prvního vlákna se použily poly d(T)-selektované poly(A)<sup>+</sup> RNA lidských ledvin, jater a plic (Clontech, Palo Alto, CA). Každá reakce se připravila s použitím čtyř mikrogramů poly(A)<sup>+</sup> RNA smíchaných s 1 µg oligo d(T)<sub>18</sub> (bez 5' fosfátu) mRNA primeru (New England Biolab, Beverly, MA) v konečném objemu 19 µl. Směsi byly zahřívány na 65°C po pět minut a ochlazeny chlazením na ledu. Syntéza cDNA byla spuštěna přidáním 8 µl 5x SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> pufru (GIBCO BRL), 2 µl 100 mM dithiothreitolu, 2 µl roztoku deoxynukleotid trifosfátů obsahujícího po 10 mM dATP, dGTP, dTTP a dCTP (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ), 2 µCi 1 µCi/µl <sup>32</sup>P-αdCTP (Amersham, Arlington Heights, IL) a 8 µl 200 jednotek/µl SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> reversní transkriptasy (Gibco BRL) ke každé směsi RNA-primer. Reakce byly inkubovány při 45°C po 1 hodinu a byly zředěny na 120 µl pomocí TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). cDNA byly sráženy dvakrát přidáním 50 µl 8 M octanu amonného a 160 µl isopropanolu. Výsledné cDNA pelety byly resuspendovány v 10 µl TE. Výtěžek cDNA

prvního vlákna byl pro každou reakci stanoven z hladiny inkorporace  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{dCTP}$ .

cDNA prvního vlákna z jaterní, plicní a ledvinové mRNA byla použita ke generování dvou segmentů cDNA, N-koncové třetiny a C-koncových dvou třetin sekvence, za použití separátních polymerasových řetězových reakcí. Do cDNA segmentů bylo zavedeno *Kpn* I restriční místo pomocí záměny jediné báze genomické sekvence s použitím PCR mutagenesy využívající primery ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) a ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC). Výsledná nukleotidová záměna vytvořila společné *Kpn* I restriční místo bez změny v predikovaném kódování aminokyselin.

N-koncový segment byl amplifikován v 50  $\mu\text{l}$  reakci obsahující 5 ng templátové cDNA (v oddělených reakcích pro cDNA ledvin, jater a plic), po 80 pmolech obou oligonukleotidů ZC7424 (TTAGACACCT GGCCAGAATG) a ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT), 5  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku deoxynukleotid trifosfátů (Cetus Corp., Emeryville, CA), 5  $\mu\text{l}$  10 x CPR pufru (Promega Corp., Madison, WI) a 2,5 jednotky Taq polymerasy (Boehringer Mannheim). Řetězová reakce byla nechána běžet po 35 cyklů (1 minuta při 94°C, 1 minuta při 58°C, a 1,5 minuty při 72°C), s následující 10 minutovou inkubací při 72°C. "Sense" primer ZC7424 (TTAGACACCT GGCCAGAATG) pokrýval 5' nepřekládanou sekvenci myšního ligandu *mpl* receptoru a zahrnoval iniciační kodon ATG. "Antisense" primer ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT) zahrnoval sekvence z oblastí odpovídajících exonům 4 a 5 lidské genomické TPO DNA.

C-koncový segment byl amplifikován v 50  $\mu\text{l}$  reakci obsahující 5 ng templátové cDNA (lidských ledvin, jater nebo plic jak je popsáno shora), po 80 pmolech obou oligonukleotidů ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC) a ZC7421 (TGATGTCGGC AGTGTCTGAG AACC), 5  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku deoxynukleotid trifosfátů (Cetus Corp.), 5  $\mu\text{l}$  10 x CPR pufru (Promega Corp.) a 2,5 jednotky Taq polymerasy (Boehringer Mannheim). Řetězová reakce byla nechána běžet po 35 cyklů (1 minuta při 94°C, 1 minuta při 65°C, a 1,5 minuty při 72°C), s následující 7 minutovou inkubací při 72°C. "Sense" primer ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC) zahrnoval sekvence z oblastí odpovídajících exonům 4 a 5 lidské genomické TPO DNA. "Antisense" primer ZC7421 (TGATGTCGGC AGTGTCTGAG AACC)



zahrnoval sekvenci z oblasti odpovídající 3' nekódující sekvence lidského genu a obsahoval translační terminační kodon.

Amplifikované produkty PCR byly analyzovány přímým sekvenováním DNA a subklonovány do pGEM-T (Promega Corp.) k další analýze porovnáváním s myší cDNA sekvencí a lidskými genomickými sekvencemi. DNA sekvence kódující lidský TPO je ukázána ve Vzorcí IV a kódovaná aminokyselinová sekvence je ukázána ve Vzorcí II. Sekvenční analýza ukazuje, že místo oštěpení signálního peptidu se nachází u aminokyseliny 22 (Vzorec II) a že maturní bílkovina začíná u aminokyseliny 22 (Vzorec II).

Lidské N-terminální a C-terminální PCR fragmenty byly vyňaty z pGEM-T jako EcoRI-KpnI fragmenty a zaligovány do EcoRI místa vektoru exprese Zem229R. Tento plasmid byl transfekován do buněk BHK 570 s použitím Lipofectamine<sup>TM</sup> (GIBCO BRL). 24 hodin po transfekci bylo kultivační médium (DMEM + PSN + 10 % FCS) nahrazeno čerstvým médiem a buňky byly inkubovány po 48 hodin bez selekčních činidel. Kondicionovaná média byla testována na proliferační aktivitu s použitím buněk BaF3/MPLR1.1 jak bylo popsáno dříve. Výsledky jasně ukázaly, že lidský TPO v kultivačním médiu stimuluje proliferaci buněk BaF3 exprimujících myší MPL receptor.

cDNA se připravila jak z lidské jaterní, tak z lidské ledvinové mRNA (získaných z Clontech Laboratories, Inc.) s použitím SUPERScript<sup>TM</sup> reversní transkriptasy (GIBCO BRL) podle výrobcových specifikací. Klony lidské TPO DNA odvozené z jater a z ledvin byly pak připraveny s použitím dvou PCR reakcí (podmínky ukázané v Tabulce 6). Reakce byly nechány běžet po 35 cyklů při 94°C po 1 minutu, 58°C po 1 minutu, 72°C po 1,5 minuty; s následující 7 minutovou inkubací při 72°C.

Tabulka 6

Reakce č. 1

5 ng cDNA jater nebo ledvin  
4  $\mu$ l oligonukleotidu ZC7454 (CCGGAATTCT TAGACACCTG  
GCCAGAATG) (20  $\rho$ M/ $\mu$ l), zavádí EcoRI místo 5' od ATG  
4  $\mu$ l oligonukleotidu ZC7422 (GGAAGCTGGG TACCAAGGAG GCT)  
(20  $\rho$ M/ $\mu$ l), vytváří Asp718 místo  
5  $\mu$ l dNTP roztoku obsahujícího 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP,  
2,5 mM dCTP a 2,5 mM dTTP  
5  $\mu$ l 10 x Taq pufu (Boehringer Mannheim)  
1  $\mu$ l Taq polymerasy (Boehringer Mannheim)  
30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Reakce č. 2

5 ng cDNA jater nebo ledvin  
4  $\mu$ l oligonukleotidu ZC7423 (AGCCTCCTTG GTACCCAGCT TCC)  
(20  $\rho$ M/ $\mu$ l), vytváří Asp718 místo  
4  $\mu$ l oligonukleotidu ZC7453 (CCGGAATTCT GATGTCGGCA  
GTGTCTGAGA ACC) (20  $\rho$ M/ $\mu$ l), zavádí EcoRI místo 3'  
od TGA  
5  $\mu$ l dNTP roztoku obsahujícího 2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP,  
2,5 mM dCTP a 2,5 mM dTTP  
5  $\mu$ l 10 x Taq pufu (Boehringer Mannheim)  
1  $\mu$ l Taq polymerasy (Boehringer Mannheim)  
30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Produkty PCR byly zpracovány fenolem/chloroformem/  
isoamylalkoholem a sraženy 95 % EtOH, usušeny a resuspendovány  
v 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Každý produkt pak byl štěpen restričními enzymy  
Asp718 a EcoRI a podroben elektroforéze v gelu 1 % agarosy.  
410 bp fragmenty (játra a ledviny) z reakce č. 1 a 699 bp  
fragmenty (játra a ledviny) z reakce č. 2 byly vyříznuty z gelu  
a eluovány z řezů gelu centrifugací přes nylonovou vatu.

PCR produkty reakce č. 1 a reakce č. 2 byly zaligovány dohromady s vektorem Zem229R (uloženým u American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 28. září 1993 pod přístupovým číslem 69447), jenž byl otevřen EcoRI, za spojení těchto dvou produktů ve vytvořeném Asp718 místě. Výsledné plasmidy byly označeny #10 (obsahuje cDNA odvozenou z ledvin) a #29 (obsahuje cDNA odvozenou z jater).

Při sekvenování těchto DNA byla nalezena jediná PCR-generovaná chyba 5' resp. 3' od unikátního AvrII místa plasmidů #28 resp. #10. Pro vytvoření bezchybné TPO DNA byl izolován 826 bp EcoRI-AvrII 5' fragment z plasmidu #10 a 283 bp AvrII-EcoRI 3' fragment z plasmidu #28. Tyto dva fragmenty byly zaligovány dohromady s vektorem Zem229R, jenž byl otevřen EcoRI. Tento plasmid byl uložen u American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 4. května 1994 jako *E. coli* DH10b transformant pod přístupovým číslem 69615.

#### Příklad 11

##### Knihovna cDNA megakaryocytů

K amplifikaci prekursorů megakaryocytů *in vivo* bylo 20 myším intraperitoneálně injikováno denně 40 000 aktivních jednotek (jednotky jsou definovány tak, že 50 jednotek/ml je potřebných u buněk BaF3/MPLR1.1 v MTT testu (Příklad 7) k získání proliferační rychlosti rovné polovině maximální) rekombinantního myšního trombopoietinu (koncentrovaného bezsérového kondicionovaného média z buněk BHK 570 stabilně transfekovaných myší trombopoietinovou cDNA). V pátý den injekcí byly vyňaty sleziny a dány do CATCH pufru + HEPES (10x Hankův vyvážený solný roztok bez vápníku a hořčíku, 10 mM HEPES (GIBCO BRL), 1,4 mM adenosin, 2,74 mM theofylin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) a 0,38 % citrát sodný, pH nastaveno hydroxidem sodným na 7,40). Sleziny byly zpracovávány po pěti tak, že na každé se provedly řezy a buňky z nich byly vytlačeny mezi dvěma nerezovými sítkami do CATCH pufru + HEPES. Po rozvolnění určitých chuchvalců buněk 25 ml pipetou byl objem zvýšen na 50 ml a buňky byly stočeny při 208 x g po 7 minut v centrifuze Sorval TJ-7. Každá

buněčná peleta byla resuspendována v 10 ml CATCH pufrem + HEPES a filtrována přes 130  $\mu\text{m}$  nylonovou sítku k získání suspenze jednotlivých buněk. Objemy byly zvýšeny na 50 ml CATCH pufrem + HEPES a buňky byly stočeny při 33 x g po 10 minut. Buněčné pelety byly resuspendovány v 10 ml CATCH pufrem + HEPES a navrstveny na třístupňový gradient Percollu (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Švédsko) (gradient 65, 40 a 27 % v 1 x CATCH pufrem + HEPES, 12 ml každého v 50 ml centrifugační kyvetě) a centrifugovány při 833 x g po 45 minut. Byly sebrány buňky mezi vrstvami 40 a 5 % Percollu a objemy byly zvýšeny na 50 ml CATCH pufrem + HEPES. Buňky byly stočeny při 208 x g po 7 minut a resuspendovány v 50 ml megakaryocytového růstového média (alfa modifikace minimálního esenciálního média, bez ribonukleosidů a desoxyribonukleosidů), s 15 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra, 2 mM L-glutamátem (složky médií získány od JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS), 1 mM pyruvátem sodným (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 1 x PSN směsí antibiotik (GIBCO BRL) a přidáními 1 000 aktivními jednotkami rekombinantního myššího trombopoietinu/ml (koncentrovaného bezsérového kondicionovaného média z buněk BHK 570 stabilně transfekovaných myšší trombopoietinovou cDNA). Buňky pak byly nanášeny na 150 mm misky pro tkáňové kultury při  $10^6$  monojaderných buňkách/ml a nechány růst v plně zvlhčovaném inkubátoru s 6,0 %  $\text{CO}_2$  ve vzduchu při 37°C. Po třech dnech růstu byly neadherované buňky sebrány do 50 ml centrifugačních kyvet a ochlazeny na ledu. Velké buňky byly peletovány centrifugací při 33 x g po 15 minut při 4°C. Buněčné pelety byly resuspendovány v 50 ml CATCH pufrem + HEPES za pokojové teploty a stočeny při 33 x g po 10 minut. (Všechny další kroky se provádějí za pokojové teploty). Toto promytí se zopakovalo s cílem získat vyšší čistotu maturních megakaryocytů. Zbývající buňky se resuspendovaly v 15 ml CATCH pufrem + HEPES (spojený objem) a navrstveny na tři stupňové gradienty fetálního bovinního séra (JRH Biosciences) (65 a 40 % v CATCH pufrem + HEPES) k sedimentaci při 1 x g po 30 minut. Spodních 5 ml z 65 %-ních frakcí se spojilo, zředilo na 50 ml CATCH pufrem + HEPES a stočilo při 33 x g po 10 minut. Pelety obsahovaly víc než  $10^7$  buněk. Buňky byly testovány na acetylcholinesterasu metodou Bursteina et al., (*J. Cell. Physiol.* 122:159-165, 1985) a byly stanoveny jako maturní megakaryocyty

o čistotě vyšší než 99 %. Peletované buňky byly pak lyzovány v roztoku guanidinium thiokyanátu/2-merkaptoethanolu k izolaci RNA centrifugací v hustotním gradientu chloridu césného.

Z megakaryocytové RNA se cDNA připraví tak, jak je uvedeno v Příkladu 6, shora.

#### Příklad 12

Mapování lidského thrombopoietinového genu fluorescenční *in situ* hybridizací.

Do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky na ledu byly přidány následující složky: 1 µg λZGmp1-H8, λZGmp1-H10 nebo λZGmp1-H29 obsahujícího lidský thrombopoietinový gen, 5 µl 10 x "nick-translačního" pufru (0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/ml BSA (prostého nukleas)), 5 µl dNTP roztoku obsahujícího 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP a 2,5 mM dCTP, 5 µl 5 mM Bio-11-dUTP (5-(N-[N-biotinyl-ε-aminokaproyl]-3-aminoallyl)-2'-deoxyuridin 5'-trifosfát, Sigma Chemical Co.), 5 µl 100 mM DTT, 5 µl DNasy (1000 x ředění ze zásobního roztoku 10 U/µl, Boehringer Mannheim, RNasy prostá), 2,5 µl DNA polymerasy I (5 U/µl, Boehringer Mannheim), H<sub>2</sub>O do konečného objemu 50 µl. Po smíchání byly reakce inkubovány při 15°C po 2 hodiny v chladičí mikrolázni typu Boekel. Reakce byly zastaveny přidáním 5 µl 0,5 M EDTA, pH 7,4. Sondy byly vyčištěny s použitím DNA-purifikačních centrifugačních kolonek Sephadex<sup>R</sup> G-50 (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) podle výrobcových instrukcí. K ověření velikostí značených sond bylo 5 - 10 µl každé vyčištěné sondy smícháno s 5 µl nakládacího gelového pufru (12,5 % ficoll, a 0,2 % bromfenolová modř, 0,2 M Tris-acetát, 0,1 mM octan sodný, 1 mM EDTA) a necháno běžet na mini-gelu 0,7 % agarosy při 80 V. Jako markery velikosti v párech bazí (bp) se použily λ-Hind III fragmenty (GIBCO BRL) a φX-Hae III fragmenty (GIBCO BRL). Digoxigeninem značená centromerická sonda specifická pro chromosom 3 (D3Z1) byla získána od firmy Oncor (Gaithersburg, MD).

Metafázové chromosomy byly získány z kultury buněk HEL. Do média v používané 100 x 15 mm Petriho misce se přidalo 100 µl

Colcemid<sup>R</sup> (GIBCO BRL, zásobní roztok 10 µg/ml) a buněčná kultura se inkubovala při 37°C. Po 2,5 - 3 hodinách se z Petriho misky s použitím 10 ml sterilní plastové pipety odebralo médium a přeneslo do 15 ml polypropylenové kónické zkumavky (Blue Max<sup>TM</sup>, Becton Dickinson). Na Petriho misku se přidalo s použitím 5 ml sterilní plastové pipety k opláchnutí 2 ml 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) a přeneslo do kónické zkumavky. Do Petriho misky se s použitím 5 ml sterilní plastové pipety přidalo 2 ml trypsinu (GIBCO BRL, zásobní roztok) a Petriho miskou se jemně zakývalo a dala se na 3 - 5 minut do 37°C-inkubátoru. Buňky se pak s použitím 5 ml sterilní plastové pipety smyly z Petriho misky a daly do zkumavky s médiem. Kultivační zkumavka se centrifugovala při 250 x g po 8 minut a celý supernatant až na 0,5 ml byl odstraněn. Peleta se resuspendovala poklepáním a pak se pomalu a jemně přidalo 8 ml 0,075 M KCl (předehřátého na 37°C). Suspenze se jemně promíchala a umístila ve vodní lázni o 37°C na 10 minut. Roztok se centrifugoval při 250 x g po 5 minut a celý supernatant až na 0,5 ml nad peletou byl odstraněn. Peleta se resuspendovala poklepáním na zkumavku. K fixování buněk se po kapkách přidaly dva ml studené směsi methanol/kyselina octová (3 : 1). Celkově se takto přidalo 8 ml fixační směsi. Zkumavka se na 20 minut umístila do lednice, s následnou centrifugací po 5 minut při 250 x g. Supernatant byl znovu odtažen a fixační proces opakován ještě dvakrát. U nanesení metafázových nátěru na 25 x 75 mm předčištěná matovaná sklička (VWR Scientific, Media, PA) se na každé skličko bodově nanese pomocí 20 µl pipetoru Pipetman<sup>TM</sup> (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, WI) 5 µl 50 % kyseliny octové a následně 5 µl suspenze buněk. Sklička byla ponechána uschnout na vzduch a pak před použitím nechána "dozrát" přes noc v 42°C-pícce (Boekel Industries, Inc., Philadelphia, PA). Na skličkách se s použitím mikroskopu vybaveného kondensorem pro fázový kontrast spočítaly vhodné metafázové nátěry. Některé preparace metafázových chromosomů byly před použitím k hybridizačním experimentům vybarveny na G-pruhy Gurrovým vylepšeným R66 Giems barvivem (BDH Ltd., Dorset, Anglie), fotografovány a odbarveny. Preparovaná sklička s nátěry lidských metafázových chromosomů byla inkubována po 2 hodiny v 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrát sodný, pH 7,0), ponořena krátce do H<sub>2</sub>O

a barvena v Gorrově Giemsa barvivu, jež bylo před použitím zředěno 1 : 4 Giemsa pufovacím roztokem, pH 6,5 (BDH Ltd.) a zfiltrováno přes filtr Whatman #1. Některé preparáty byly před inkubací v SSC napřed inkubovány po 45 minut až 1 hodinu v pícce při 90°C a ponechány vychladnout. Preparáty pak byly rozlišeny v pufovaném roztoku Giemsa, opláchnuty H<sub>2</sub>O a usušeny na vzduchu. Vhodné nátěry metafázových chromosomů s G-pruhy fotografovány na mikroskopu Olympus s použitím inverzního filmu Kodak Ektachrome<sup>TM</sup> 400, a digitalizovány a uloženy s použitím barevného video-kamerového systému Optronics (Goleta, CA) ZVS-47E CCD RGB a software Optimus (od BioScan Inc., Edmonds, WA). Preparáty byly před dalším použitím odbarveny po asi 20 min. v 100 % ETOH a usušeny na vzduchu. Nepoužité preparáty sklíček s metafázovými chromosomy byly skladovány při -70°C.

Hybridizační směsi se připravovaly v 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavkách smícháním 2,5 µl kompetitorové DNA (Cot-1 DNA, GIBCO BRL) 40 - 60 ng biotinylem značeného fága λZGmp1-H8, λZGmp1-H10 nebo λZGmp1-H29 (obsahujícího lidský thrombopoietinový gen), 7 µg nosičové DNA (denaturovaná DNA lososích testes, Sigma Chemical Co.), 1 ml 3 M NaOAc a 2 objemů ethanolu; byly vakuově odpařeny v koncentrátoru typu Speedvac. Pelety byly rozpuštěny v 10 µl hybridizačního roztoku, sestávajícího z 10 % dextran sulfátu, 2 x SSC a 50 % formamidu (EM Science, Gibbstown, NJ). DNA sondy a kompetitorová DNA byly denaturovány při 70 - 80°C po 5 minut, ochlazeny na ledu a předhybridizovány při 37°C po 1 - 2 hodiny. Denaturace chromosomů se provedla ponořením každého sklíčka do 70 % formamidu, 2 x SSC při 70 - 80°C na 5 minut, s následujícím okamžitým ochlazením v ledově chladném 70 % ethanolu, pak v 100 % ethanolu, pokaždé po 5 - 10 minut. Pak byla sklíčka těsně před tím, než na ně byly pomocí 20 µl pipetoru Gilson Pipetman<sup>TM</sup> pipetovány hybridizační směsi, usušena na vzduch a zahřáta na 42°C. Hybridizační směsi a chromosomy pak byly pokryty 18 x 18 mm krycími sklíčky No. 1 (VWR Scientific). Hybridizace probíhala ve vlhké komůrce při 37°C přes noc. V některých případech se po přibližně 6 hodinách hybridizačního času přidalo k preparátům 5 - 10 ng denaturované, digoxigeninem značené centromerické sondy D3Z1 (v hybridizačním roztoku 10 % dextran sulfátu, 2 x SSC a 50 % formamidu).

Po odstranění krycích sklíček se sklíčka s preparáty promývala 3 x 5 minut v 50 % formamidu, 2 x SSC při 42°C, 3 x 5 minut v 2 x SSC při 42°C, a 1 x 3 minuty v 4 x SSC, 0,05 % monolaurátu polyoxyethylensorbitanu (Tween-20, Sigma Chemical Co.). Toto bylo následováno 20 minutovou inkubací s 4 x SSC, 5 % netučného sušeného mléka ve vlhké komůrce (100 µl pod krycím sklem 24 x 50 mm). Pro preparace které zahrnovaly centromerickou sondu D3Z1 pro chromosom 3 se pak prováděla 45-minutová inkubace s 1 : 100 ředěním biotinem značené myší anti-digoxinové protilátky (Sigma Chemical Co.) v 4 x SSC / 5 % BSA, následovaná třikrát 3-minutovým mytím v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20. Pak pro všechny preparace následovaly post-hybridizační kroky, s 20 minutami inkubace s fluorescein-značeným avidinem (Fluorescein Avidin, DCS, Vector Laboratories, Burlingame, CA) (100 µl, 5 µg/ml, v 4 x SSC, 5 % netučného sušeného mléka) pod krycím sklem 24 x 50 mm. Sklíčka pak byla myta 3 x 3 minuty v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20, s následující 20 minutovou inkubací s biotinylovanou ovčí protilátkou proti avidinu D (afinitně purifikovanou, Vector Laboratories) (5 µg/ml v 4 x SSC, 5 % netučného sušeného mléka) pod krycím sklem 24 x 50 mm. Sklíčka pak byla znovu myta 3 x 3 minuty v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20, s následující další inkubací s fluorescein-značeným avidinem (100 µl, 5 µg/ml, v 4 x SSC, 5 % netučného sušeného mléka) pod krycím sklem 24 x 50 mm. V některých případech byl tento postup amplifikace signálu zopakován ještě jednou. Finální promytí bylo 2 x 3 minuty v 4 x SSC, 0,05 % Tween-20 a 1 x 3 minuty v 1 x PBS. Sklíčka byla upevněna na protistínící médium sestávající z 9 dílů glycerolu obsahujícího 2 % 1,4-diazobicyklo-(2,2,2)-oktanu (DABCO, rozpuštěn při 70°C) a 1 dílu 0,2 M Tris-HCl, pH 7, 5, a 0,25 až 0,5 µg/ml propidium jodidu. Sklíčka byla prohlížena na mikroskopu Olympus BH2 vybaveném BH2-RFC přídatným zařízením pro fluorescenci v odraženém světle, PM-10 ADS automatickým fotomikrografickým systémem, ZVS-47E CCD RGB barevným video-kamerovým systémem Optronics, a sadou filtrů FITC/Texas Red, Chroma Technology Corp. (Brattlebow, VT), k vizualizaci FITC. Obrazy nátěrů metafázových chromosomů byly digitalizovány a uloženy s použitím barevného video-kamerového systému Optronics a software Optimus.



Předběžné výsledky z postupu fyzikálního mapování ukázaly, že lokus lidského thrombopoietinového genu je distální k oblasti 3q26 ramene q chromosomu 3.

### Příklad 13

Exprese myší TPO cytokinové domény v *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmid pABJ3-5 obsahuje promotor *S. cerevisiae* *TPI1*, sekreční zaváděcí sekvenci  $\alpha$ -faktoru, myší TPO kóující sekvenci (Vzorec III) od bp 237 po 692, translační terminátor *TPI1*, 2 $\mu$  sekvence pro replikaci v kvasinkách a triosofosfát isomerasový gen *Schizosaccharomyces pombe* (*POT1* gen) k selekci v kvasinkách. Tento plasmid byl určen k řízení sekrece myší TPO bílkoviny obsahující aminokyseliny 45 - 196 ze Vzorce I.

Pro konstrukci pBJ3-5 byl pMVR1 (Obrázek 2) digеровán SphI a XbaI, a byl získán základ vektoru, obsahující 5' část promotoru *TPI1* a terminátor *TPI1*. Do základu vektoru byly vloženy následující fragmenty:

- 1) SphI/HindIII fragment odvozený z pBS114, jenž obsahuje 3' část *TPI1* promotoru a zaváděcí sekvenci  $\alpha$ -faktoru. Plasmid pBS114 je kvasinkový přehazovací [*shuttle*] vektor, jenž obsahuje promotor *TPI1* a zaváděcí sekvenci  $\alpha$ -faktoru, následovanou sekvencí poly-spojky, která zahrnuje HindIII místo.
- 2) PCR-generovaný HindII/SalI fragment obsahující HindII místo, určené k tomu, aby bylo ve stejném čtecím rámci s HindIII místem v zaváděcí sekvenci  $\alpha$ -faktoru, Kex2 místo protolytického štěpení a myší TPO sekvenci od bp 237 po 335 ze Vzorce III.
- 3) SalI/EcoRI fragment obsahující myší TPO páry bází od 336 po 692 ze Vzorce III, jenž byl odvozen z plasmidu pSL-MPL-100 (zkonstruovaného amplifikací pZGmpl-1081 s použitím primerů ZC7319 (ACACTGAATT CTTCTCCACC CGGACAGAGT) a ZC7318 (TACCGAATTC TAGACACAGA GGGTGGGACC TTC), digescí EcoRI a zaklonováním fragmentu obsahujícího cytokinovou doménu

a 5' nekódující sekvenci do EcoRI místa Zem229R [ATCC 69447]). Tento fragment byl zaměněn na Sali/XbaI fragment jeho klonováním do pIC19H, který byl předtím digеровán Sali a EcoRI.

Výsledný plasmid, označený pBJ3 (Obrázek 2), byl pak digеровán BglII a XhoI pro uvolnění celé kazety exprese obsahující promotor, zaváděcí sekvenci, TPO kódující sekvenci a terminátor. Tento BglII/XhoI fragment byl vložen do pRPOT (zveřejněného v US patentu č. 5 128 321, jenž je zde zahrnut odkazem) digеровaného BamHI a XhoI. Výsledný plasmid byl označen pBJ3-5.

*S. cerevisiae* kmene JG134 (*MATa ura3-52 leu2- Δ2 pep4- Δ1 Δtpil::URA3 [cir<sup>0</sup>]*) byly transformovány pBJ3-5 a pRPOT lithium acetátovým postupem (jak je obecně zveřejněno Itoem et al., *J. Bacteriol.* 153: 163-168, 1983). Transformanty se selektovaly pomocí růstu na médiích obsahujících glukosu. JG134/pBJ3-5 a JG134/pRPOT se nechaly růst na tekutém médiu YEPD po tři dny. Kultivační média byla separována od buněk centrifugací a analyzována v testu buněčné proliferace s BaF3 buňkami obsahujícími MPL receptor. Média z kmene JG134/pBJ3-5 obsahovala 5000 - 7000 jednotek/ml TPO aktivity, zatím co negativní kontrola JG134/pRPOT neměla žádnou aktivitu. Tento výsledek ukazuje, že kvasinky mohou secernovat biologicky aktivní formu TPO.

#### Příklad 14

##### Aktivita rekombinantního lidského TPO

Plasmidová DNA ze dvou bakteriálních kultur s pZGmpl-124 kultivovaných přes noc byla připravena pomocí alkalické lyze buněk, následované navázáním DNA k náplni při vysoké soli (s použitím soupravy Magic Minipreps<sup>TM</sup> Sampler od Promega Corp.). DNA byla eluována 75 μl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0.

Kultury buněk BHK 570 byly při 50 000 buňkách/ml transfekovány pZGmpl-124 DNA. 20 μl ředění 1 : 10 LIPOFECTAMINE<sup>TM</sup> (GIBCO BRL) se přidalo k 20 μl plasmidové DNA a 160 μl bezsérového média (F/DV médium [směs 1 : 1 DMEM a Ham F12])

doplněné 10 µg/ml fetuinu, 2 ng/ml selenu, 5 µg/ml insulinu, 10 µg/ml transferinu, 2 mM L-glutaminem, 110 µg/ml pyruvátu sodného, 25 mM HEPES a 0,1 mM roztokem neesenciálních aminokyselin (GIBCO BRL)) při pokojové teplotě na 30 minut před přidáním buněk BHK 570 a inkubovalo 4 hodiny při 37°C. Pak se přidalo 200 µl růstového média (DMEM (Biowhittaker) doplněného 110 µg/ml pyruvátu sodného, 0,05 mg/ml penicilinu, 0,05 mg/ml streptomycinu, 0,01 mg/ml neomycinu, 25 mM HEPES, 10 % fetálního telecího séra a buňky se inkubovaly při 37°C přes noc. Kultivační médium se nahradilo růstovým médiem obsahujícím 5 % fetálního telecího séra a buňky se inkubovaly 4 hodiny při 37°C.

Kondicionovaná média z transfektantů buněk BHK 570 se testovala na schopnost způsobit proliferaci buněk exprimujících myší MPL receptor. Buňky rostly v BaF3 médiu (RPMI 1640 médium (JRH Biosciences) doplněné 10 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminem, 1 mM pyruvát sodným, 10 mM HEPES, 57 µM β-merkaptoethanolem, 0,05 mg/ml penicilinu, 0,05 mg/ml streptomycinu, 0,01 mg/ml neomycinu, 4 % (obj./obj.) kondicionovaného média z WEHI-3 buněk (kultivační přídavek myšího interleukinu-3, Collaborative Biomedical Products)). Před testem se BaF3 buňky zředily a resuspendovaly v BaF3 médiu bez IL-3 na 10 000 buněk/100 µl. Přidalo se 100 µl kondicionovaného média z buněk BHK 570 transfekovaných pZGmpl-124 a kultury se inkubovaly při 37°C. Po 30 minutách a po 24 hodinách byly buňky vizuálně prohlíženy zda se prodlužují. Testovala se rovněž negativní kontrola, sestávající z BaF3 média bez IL-3, a pozitivní kontrola kondicionovaného média z BHK 570 buněk transfekovaných myší TPO DNA. Výsledky ukázaly chybějící prodlužování buněk BaF3 u negativní kontrole, určité prodlužování buněk u pozitivní kontroly a významné prodlužování buněk pro pZGmpl-124-transfekované buňky.

## Příklad 15

### Afinitní precipitace receptoru

150 mm misky pro tkáňové kultury, obsahující buňky, jež produkují TPO nebo normální buňky BHK, se značily po 18 hodin s 10 ml Dulbeccova MEM bez methioninu, obsahujícího 2 mM L-glutamin, antibiotika a 200  $\mu$ Ci preparátu  $^{35}$ S-Express (Amersham, Arlington Heights, IL).

Po inkubaci přes noc byla použitá média sebrána a zkoncentrována 15 krát s použitím koncentrátoru Centriprep-10<sup>TM</sup> (Amicon, Inc.). Výsledných 0,7 ml koncentrovaného supernatantu se smíchalo s 40  $\mu$ l rozpustného MPL receptoru, majícího připojený poly-histidin, který byl navázán podle návodu dodavatele k CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia). Směs byla za třepání inkubována dvě hodiny na ledu.

Buňky byly promyty jedenkrát s PBS, pak lyzovány 1 ml RIP A puftru (10 mM Tris, pH 7,4, 1 % desoxycholát, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl). Lyzát se zcentrifugoval k odstranění nerozpustného materiálu a přidalo se 40  $\mu$ l MPL-Sepharose jako shora.

MPL-Sepharose pak byla usazena centrifugací při malých obrátkách a použitá média nebo buněčné lyzáty se odstranily. Peleta se myla čtyřikrát s PBS obsahujícím 0,5 M NaCl. Po posledním mytí se PBS odstranil a přidalo se 40  $\mu$ l 2 x vzorkového puftru (10 % glycerol, 4 % SDS, 50 mM Tris, pH 7,0, 1 mM EDTA, a 0,05 % bromfenolová modř) obsahujícího 4 % beta-merkapt ethanolu.

Vzorky se vařily po 5 minut a po 18  $\mu$ l z každého vzorku se nanoslo na 10 - 20 % gradientový mini-gel (Integrated Separation Systems), a pak podrobilo elektroforéze při 100 V po dvě hodiny. Gel byl fixován po 30 minut (v 40 % methanolu, 16 % ledové kyselině octové v destilované vodě), pak namočen do roztoku Amplify<sup>TM</sup> (Amersham) na dvacet minut.

Po usušení byl gel přes noc exponován na film. -70 kDa pruh byl silně viditelný v dráze odpovídající v použitých médiích z buněk transfekovaných TPO cDNA. Tento pruh nebyl přítomen v použitých médiích z BHK buněk nebo v buněčných lyzátech žádné buněčné linie.

Z předchozího bude rozpoznáno, že i když zde byla pro účele vysvětlování popsána konkrétní provedení vynálezu, mohou se bez odklonu od ducha a rozsahu vynálezu provádět různé modifikace vynálezu. V souladu s tím není tento vynález omezen jinak než připojenými nároky.

Seznam sekvencí:

Vzorec I

Met Ala Pro Gly Lys Ile Gln Gly Arg Gly Pro Ile Gln Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Ser Val Arg His Leu Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala  
20 25 30

Ala Met Leu Leu Ala Val Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala  
35 40 45

Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His  
50 55 60

Leu Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser  
65 70 75 80

Ile Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys  
85 90 95

Thr Gln Thr Glu Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser  
100 105 110

Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser  
115 120 125

(pokr. Vzorce I)

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu  
130 135 140

Leu Gly Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly  
145 150 155 160

Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln  
165 170 175

Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro  
180 185 190

Thr Leu Cys Val Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser  
195 200 205

Thr Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr Ser Gly  
210 215 220

Leu Leu Glu Thr Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala Gly Pro Gly  
225 230 235 240

Leu Leu Ser Arg Leu Gln Gly Phe Arg Val Lys Ile Thr Pro Gly Gln  
245 250 255

Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile Ser Gly Tyr Leu Asn  
260 265 270

Arg Thr His Gly Pro Val Asn Gly Thr His Gly Leu Phe Ala Gly Thr  
275 280 285

Ser Leu Gln Thr Leu Glu Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Phe Asn  
290 295 300

Lys Gly Ser Leu Ala Phe Asn Leu Gln Gly Gly Leu Pro Pro Ser Pro  
305 310 315 320

Ser Leu Ala Pro Asp Gly His Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu  
325 330 335

Pro Thr Thr His Gly Ser Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp  
340 345 350

Pro Ser Thr Thr Met Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met  
355 360 365

Tyr Pro His Pro Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr  
370 375

Vzorec II

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala  
1 5 10 15

Arg Leu Thr Leu Ser 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 Ser  
35 40 45

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala  
50 55 60

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys  
65 70 75 80

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met  
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly  
100 105 110

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu  
115 120 125

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp  
130 135 140

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val  
145 150 155 160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala  
165 170 175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu  
180 185 190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr  
195 200 205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly  
210 215 220

(pokr. Vzorce II)

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu  
225 230 235 240

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly  
245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro  
260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu  
275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr  
290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu  
305 310 315 320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu  
340 345 350

Gly

Vzorec III

CCTCGTGCCG GTCCTGAGGC CCTTCTCCAC CCGGACAGAG TCCTTGCCCC ACCTCTCTCC 60

CACCCGACTC TGCCGAAAGA AGCACAGAAG CTCAAGCCGC CTCC ATG GCC CCA GGA 116  
Met Ala Pro Gly  
1

AAG ATT CAG GGG AGA GGC CCC ATA CAG GGA GCC ACT TCA GTT AGA CAC 164  
Lys Ile Gln Gly Arg Gly Pro Ile Gln Gly Ala Thr Ser Val Arg His  
5 10 15 20

CTG GCC AGA ATG GAG CTG ACT GAT TTG CTC CTG GCG GCC ATG CTT CTT 212  
Leu Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu  
25 30 35



GCA GTG GCA AGA CTA ACT CTG TCC AGC CCC GTA GCT CCT GCC TGT GAC Ala Val Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp 40 45 50	260
CCC AGA CTC CTA AAT AAA CTG CTG CGT GAC TCC CAC CTC CTT CAC AGC Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Leu Leu His Ser 55 60 65	308
CGA CTG AGT CAG TGT CCC GAC GTC GAC CCT TTG TCT ATC CCT GTT CTG Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val Leu 70 75 80	356
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC CTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ACG GAA Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu 85 90 95 100	404
CAG AGC AAG GCA CAG GAC ATT CTA GGG GCA GTG TCC CTT CTA CTG GAG Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Ser Leu Leu Leu Glu 105 110 115	452
GGA GTG ATG GCA GCA CGA GGA CAG TTG GAA CCC TCC TGC CTC TCA TCC Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Glu Pro Ser Cys Leu Ser Ser 120 125 130	500
CTC CTG GGA CAG CTT TCT GGG CAG GTT CGC CTC CTC TTG GGG GCC CTG Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu 135 140 145	548
CAG GGC CTC CTA GGA ACC CAG CTT CCT CTA CAG GGC AGG ACC ACA GCT Gln Gly Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Leu Gln Gly Arg Thr Thr Ala 150 155 160	596
CAC AAG GAC CCC AAT GCC CTC TTC TTG AGC TTG CAA CAA CTG CTT CGG His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Leu Ser Leu Gln Gln Leu Leu Arg 165 170 175 180	644
GGA AAG GTG CGC TTC CTG CTT CTG GTA GAA GGT CCC ACC CTC TGT GTC Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Glu Gly Pro Thr Leu Cys Val 185 190 195	692
AGA CGG ACC CTG CCA ACC ACA GCT GTC CCA AGC AGT ACT TCT CAA CTC Arg Arg Thr Leu Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Ser Thr Ser Gln Leu 200 205 210	740



(pokr. Vzorce III)

CAGCTTCTCT CGGGGACAAG CTTCCCCAGG AAGGCTGAGA GGCAGCTGCA TCTGCTCCAG	1331
ATGTTCTGCT TTCACCTAAA AGGCCCTGGG GAAGGGATAC ACAGCACTGG AGATTGTAAA	1391
ATTTTAGGAG CTATTTTTTT TTAACCTATC AGCAATATTC ATCAGAGCAG CTAGCGATCT	1451
TTGGTCTATT TTCGGTATAA ATTTGAAAAT CACTA	1486

Vzorec IV

ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA	48
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
1 5 10 15	
AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC	96
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
20 25 30	
CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC	144
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
35 40 45	

(pokr. Vzorce IV)

CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT	192
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
50 55 60	
GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG	240
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
65 70 75 80	
GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG	288
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
85 90 95	
GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG	336
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
100 105 110	
CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC	384
Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu	
115 120 125	
CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT	432
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp	
130 135 140	
CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG	480
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val	
145 150 155 160	
CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC	528
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala	
165 170 175	
CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG	576
Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu	
180 185 190	
AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT	624
Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr	
195 200 205	
GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA	672
Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly	
210 215 220	



Vzorec V

CTTCTTGCT TTCTTTCTTT CTTTCTTCT TTCTTTTTTT TTTTGGAGAC GGAGTTTCAC 60  
TCTTATTGCC CAGGCTGGAG TGCAATGGTG CGATCTCGGC TCACCACAAC CTCCGCCTCC 120  
CAGGTACAAG CGATTCTCCT GTCTCAGCCT CCCAAGTAGC TTGGATTACA GGCATGAACC 180  
ACCACACCCT GCTAGTTTTT TTGTATTTTC TAGAGCCGGG GTTTCACCAT GTTAGTGAGG 240  
CTGGTGGCGA ACTCCTGACC TCAGGTGATC CACCCGCCTT GGA CTCCAA AGTGCTGGGA 300  
TTACAGGCAT GAGCCACTGC ACCCGGCACA CCATATGCTT TCATCACAAG AAAATGTGAG 360  
AGAATTCAGG GCTTTGGCAG TTCCAGGCTG GTCAGCATCT CAAGCCCTCC CCAGCATCTG 420  
TTCACCCTGC CAGGCAGTCT CTTCTAGAA ACTTGGTTAA ATGTTCACTC TTCTTGCTAC 480  
TTTCAGGATA GATTCTTAC CCTTGGTCCG CCTTTGCCCC ACCCTACTCT GCCCAGAAGT 540  
GCAAGAGCCT AAGCCGCCTC CATGGCCCCA GGAAGGATTC AGGGGAGAGG CCCCAAACAG 600  
GGAGCCACGC CAGCCAGACA CCCC GGCCAG A ATG GAG CTG ACT G GTGAGAACAC 654  
Met Glu Leu Thr  
1  
ACCTGAGGGG CTAGGGCCAT ATGGAAACAT GACAGAAGGG GAGAGAGAAA GGAGACACGC 714  
TGCAGGGGGC AGGAAGCTGG GGAACCCAT TCTCCAAAA ATAAGGGGTC TGAGGGGTGG 774  
ATTCCTGGG TTTCAGGTCT GGGTCCTGAA TGGAATTCC TGAATACCA GCTGACAATG 834  
ATTCCTCCT CATCTTTCAA CCTCACCTCT CCTCATCTAA G AA TTG CTC CTC 886  
Glu Leu Leu Leu  
5  
GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT 934  
Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala  
10 15 20  
CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC 982  
Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser  
25 30 35 40

CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG GTGAGAACTC CCAACATTAT CCCCTTTATC His Val Leu His Ser Arg Leu 45	1033
CGCGTAACTG GTAAGACACC CATACTCCCA GGAAGACACC ATCACTTCCT CTAACCTCCT	1093
GACCCAATGA CTATTCTTCC CATATTGTCC CCACCTACTG ATCACACTCT CTGACAAGGA	1153
TTATTCTTCA CAATACAGCC CGCATTTAAA AGCTCTCGTC TAGAGATAGT ACTCATGGAG	1213
GACTAGCCTG CTTATTAGGC TACCATAGCT CTCTCTATTT CAGCTCCCTT CTCCCCCAC	1273
CAATCTTTTT CAACAG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr 50 55	1322
CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr 60 65 70	1370
CAG ATG GTAAGAAAGC CATCCCTAAC CTTGGCTTCC CTAAGTCCTG TCTTCAGTTT Gln Met 75	1426
CCCCTGCTT CCCATGGATT CTCCAACATT CTTGAGCTTT TAAAAAATAT CTCACCTTCA	1486
GCTTGGCCAC CCTAACCCAA TCTACATTCA CCTATGATGA TAGCCTGTGG ATAAGATGAT	1546
GGCTTGCAGG TCCAATATGT GAATAGATTT GAAGCTGAAC ACCATGAAAA GCTGGAGAGA	1606
AATCGCTCAT GGCCATGCCT TTGACCTATT CCCGTTCACT CTTCTTAAAT TGGCATGAAG	1666
AAGCAAGACT CATATGTCAT CCACAGATGA CACAAAGCTG GGAAGTACCA CTAAAATAAC	1726
AAAAGACTGA ATCAAGATTC AAATCACTGA AAGACTAGGT CAAAAACAAG GTGAAACAAC	1786
AGAGATATAA ACTTCTACAT GTGGGCCGGG GGCTCACGCC TGTAATCCCA GCACTTTGGG	1846
AGGCCGAGGC AGGCAGATCA CCTGAGGGCA GGAGTTTGAG AGCAGCCTGG CCAACATGGC	1906
GAAACCCCGT CTCTACTAAG AATACAGAAT TAGCCGGGCA TGGTAGTGCA TGCCTGTAAT	1966
CCCAGCTACT TGGAAGGCTG AAGCAGGAGA ATCCCTTGAA CCCAGGAGGT GGAGGTTGTA	2026
GTGAGCTGAG ATCATGCCAA TGCACTCCAG CCTGGGTGAC AAGAGCAAAA CTCCGTCTCA	2086

AAAAGAAAA AAAATTCTAC ATGTGTAAT TAATGAGTAA AGTCCTATTC CAGCTTTCAG 2146  
GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT AGCACTTCTT ACGAAAAGGA 2206  
TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA CCATGTAACA TTAAGTGAAGC TGCTATTCTT 2266  
AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAG TGCTCGTACA 2326  
GAACTCTATT CCGAGTGGAC TACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 2386  
GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAC TAACATGTGT CTAGAAAGCA 2446  
GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG CAATAGTTTA AAAAATAAA 2506  
ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTC TTCCTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG 2566  
CAGTTCCTAT GGGTCCCTC TAGTCCTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT 2626  
CTCATACCTA CATTAGTTT ATTTATTATT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 2686  
CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC CCGGATTCAA 2746  
GCGATTCTCC TGTCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC AGGTGCCAC CACCATGCCC 2806  
AGCTAATTTG TGTATTTGTG GTAGAGATGG GGTTTCACCA TGTGGGCAG GCTGATCTTG 2866  
AACTCCTGAC CTCAGGTGAT CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG 2926  
TGAGCCACTG CACCCAGCCT TCATTCAGTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGCAG 2986  
CAGAAAGAGT AAATTTGCAG CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA GGGCAGATTT 3046  
CAGCAACGTA AGAAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA AGTGTAAGAC CAGGCTGGAC 3106  
TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG CTGATGACCA GCTGTCGGGA GACTGTGAAG 3166  
GAATTCCTGC CCTGGGTGGG ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCATC 3226  
TGCTGGCTAC TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTGAGG CAGTGCCTT 3286  
CTCTCTTCCA TCTCTTCTC AG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA 3338  
Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly



GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu 90 95 100	3386
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val 105 110 115	3434
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln 120 125 130	3476
GTAAGTCCCC AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCCTAGAA	3536
GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG ATCTACTAAG	3596
AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC TGTCTTTCCT ACTTAGACAA	3656
GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAG	3712
CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile 135 140 145	3760
TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met 150 155 160	3808
CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr 165 170 175 180	3856
GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro 185 190 195	3904
AAC AGG ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg 200 205 210	3952
ACT ACT GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys 215 220 225	4000

(pokr. Vzorce V)

ATT CCT GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro 230 235 240	4048
GGA TAC CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu 245 250 255 260	4096
TTT CCT GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser 265 270 275	4144
GGA ACA TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr 280 285 290	4192
TCT CCT TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro 295 300 305	4240
CTT CCA CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu 310 315 320	4288
CCT GAC CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn 325 330 335 340	4336
ACA TCC TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 345 350	4385
AGACTGACC GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCTGCAG GGCGCCCCTG	4445
GGAGACAACT GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA	4505
TACACAGGAC TGAAAAGGGA ATCATTITTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT	4565
TTTTTAAGCT ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCAGA	4625
AATTTGCAAC TCACTGATTC TCAACATGCT CTTTTTCTGT GATAACTCTG CAAAGACCTG	4685

(pokr. Vzorce V)

GGCTGGCCTG GCAGTTGAAC AGAGGGAGAG ACTAACCTTG AGTCAGAAAA CAGAGGAAGG 4745  
GTAATTTCTT TCGCTTCAAA TTCAAGGCCT TCCAACGCC CCATCCCCTT TACTATCATT 4805  
CTCAGTGGGA CTCTGATC 4823

---

Vzorec VI

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15  
Leu Pro Asn Gln Ala Gln Val Thr Ser Gln Asp Val Phe Leu Leu Ala  
20 25 30  
Leu Gly Thr Glu Pro Leu Asn Cys Phe Ser Gln Thr Phe Glu Asp Leu  
35 40 45  
Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln  
50 55 60  
Leu Leu Tyr Ala Tyr Arg Gly Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Tyr  
65 70 75 80

(pokr. Vzorce VI)

Ser Gln Ser Val Pro Thr Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro  
85 90 95

Ala Gln Asp Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys  
100 105 110

Asn Val Ser Leu Asn Gln Thr Leu Ile Gln Arg Val Leu Phe Val Asp  
115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Arg Val Ile Lys Ala Arg Gly Gly  
130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile His Trp Glu Ala Pro Ala Pro Glu  
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg His Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Thr Asp Ser  
165 170 175

Ser Asn Ala Thr Ala Pro Ser Val Ile Gln Leu Leu Ser Thr Glu Thr  
180 185 190

Cys Cys Pro Thr Leu Trp Met Pro Asn Pro Val Pro Val Leu Asp Gln  
195 200 205

Pro Pro Cys Val His Pro Thr Ala Ser Gln Pro His Gly Pro Val Arg  
210 215 220

Thr Ser Pro Ala Gly Glu Ala Pro Phe Leu Thr Val Lys Gly Gly Ser  
225 230 235 240

Cys Leu Val Ser Gly Leu Gln Ala Gly Lys Ser Tyr Trp Leu Gln Leu  
245 250 255

Arg Ser Gln Pro Asp Gly Val Ser Leu Arg Gly Ser Trp Gly Pro Trp  
260 265 270

Ser Phe Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Thr Ile Gly  
275 280 285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Met Val Thr Cys Gln Trp Gln  
290 295 300

Gln Gln Asp Arg Thr Ser Ser Gln Gly Phe Phe Arg His Ser Arg Thr  
305 310 315 320

(pokr. Vzorce VI)

Arg Cys Cys Pro Thr Asp Arg Asp Pro Thr Trp Glu Lys Cys Glu Glu  
325 330 335

Glu Glu Pro Arg Pro Gly Ser Gln Pro Ala Leu Val Ser Arg Cys His  
340 345 350

Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu Val Glu Val Thr  
355 360 365

Thr Ala Gln Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp Ile  
370 375 380

His Gln Ala Val Leu Leu Pro Thr Pro Ser Leu His Trp Arg Glu Val  
385 390 395 400

Ser Ser Gly Arg Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Gln Ser Ser Trp Ala  
405 410 415

Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly Arg Glu  
420 425 430

Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Ser Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr Leu  
435 440 445

Glu Leu Arg Pro Arg Ala Arg Tyr Ser Leu Gln Leu Arg Ala Arg Leu  
450 455 460

Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ala Trp Ser Pro Pro Ala  
465 470 475 480

Arg Val Ser Thr Gly Ser Glu Thr Ala Trp Ile Thr Leu Val Thr Ala  
485 490 495

Leu Leu Leu Val Leu Ser Leu Ser Ala Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu  
500 505 510

Lys Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp  
515 520 525

Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp  
530 535 540

Thr Ala Ala Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Val Thr Asp Ser Cys Glu  
545 550 555 560

(pokr. Vzorce VI)

Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Ser  
565 570 575

Thr Pro Leu Pro Leu Cys Pro Ser Gln Pro Gln Met Asp Tyr Arg Gly  
580 585 590

Leu Gln Pro Cys Leu Arg Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro Met  
595 600 605

Ala Glu Thr Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser Tyr  
610 615 620

Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro  
625 630

Vzorec VII

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala  
1 5 10 15

Arg Leu Thr Leu Ser 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 Ser  
35 40 45

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala  
50 55 60

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys  
65 70 75 80

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Glu Gly Val Met  
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly  
100 105 110

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu  
115 120 125

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp  
130 135 140

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val  
145 150 155 160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala  
165 170 175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu  
180 185 190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr  
195 200 205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly  
210 215 220

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu  
225 230 235 240

(pokr. Vzorce VII)

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly  
245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro  
260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu  
275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr  
290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu  
305 310 315 320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu  
340 345 350

Gly



P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Izolovaná bílkovina, vybraná ze skupiny sestávající z

- a) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196;
- b) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 206;
- c) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173;
- d) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 175;
- e) alelických variant a), b), c) a d); a
- f) druhových homologů a), b), c), d) a e), přičemž bílkovina stimuluje proliferaci a diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů.

2. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina obsahuje sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 379.

3. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina obsahuje sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 353.

4. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina je myší bílkovina.

5. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina je lidská bílkovina.

6. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina obsahuje:

sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorcí I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 379,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorcí I od aminokyselinového zbytku 24 po aminokyselinový zbytek 196,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorcí I od

aminokyselinového zbytku 24 po aminokyselinový zbytek 206,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 24 po aminokyselinový zbytek 379,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 196,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 206,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 379.

7. Izolovaná bílkovina podle nároku 1, přičemž řečená bílkovina obsahuje:

sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 173,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 175,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 1 po aminokyselinový zbytek 353,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 353.

8. Izolovaná bílkovina sestávající v podstatě ze sekvence vybrané ze skupiny zahrnující:

sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 206,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci I od  
aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 379,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 175,  
sekvenci aminokyselin ukázanou ve Vzorci II od  
aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 353.

9. Izolovaná bílkovina, jež stimuluje proliferaci a diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů, přičemž řečená bílkovina obsahuje úsek, jenž je na úrovni aminokyselin alespoň z 80 % identický s aminokyselinovou sekvencí Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196, nebo se sekvencí aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173.

10. Izolovaná polynukleotidová molekula kódující bílkovinu podle nároku 1.

11. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 10, přičemž řečená molekula je DNA molekula, obsahující kódující vlákno, jež obsahuje nukleotidovou sekvenci Vzorce III od nukleotidu 237 po nukleotid 692.

12. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 10, přičemž řečená molekula je DNA molekula, obsahující kódující vlákno, jež obsahuje nukleotidovou sekvenci Vzorce IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519.

13. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 10, přičemž řečená molekula kóduje aminokyselinovou sekvenci Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196.

14. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 10, přičemž řečená molekula kóduje aminokyselinovou sekvenci Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173.

15. Izolovaná polynukleotidová molekula vybraná ze skupiny sestávající z

a) DNA molekul kódujících hematopoetickou bílkovinu a obsahujících sekvenci nukleotidů ukázanou ve Vzorcí III od nukleotidu 237 po nukleotid 692,

b) DNA molekul kódujících hematopoetickou bílkovinu a obsahujících sekvenci nukleotidů ukázanou ve Vzorcí IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519,

- c) alelických variant a) nebo b),
- d) DNA molekul kódujících hematopoetickou bílkovinu, jež je v aminokyselinové sekvenci alespoň z 80 % identická s bílkovinami kódovanými v a), b) nebo c)
- e) molekul komplementárních k a), b), c) nebo d).

16. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 15, přičemž řečená molekula kóduje hematopoetickou bílkovinu, jež je v aminokyselinové sekvenci alespoň z 90 % identická s bílkovinami kódovanými v a), b) nebo c).

17. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 15, přičemž řečená molekula zahrnuje nukleotid 237 až nukleotid 722 ze Vzorce III nebo nukleotid 64 až nukleotid 525 ze Vzorce IV.

18. Izolovaná DNA molekula vybraná ze skupiny sestávající z

- a) *EcoRI-XhoI* inzertu plasmidu pZGmp1-1081 (ATCC 69566),
- b) alelické varianty a), a
- c) DNA molekul kódujících bílkovinu, jež je ve své aminokyselinové sekvenci alespoň z 80 % identická s bílkovinou kódovanou a) nebo b), přičemž řečená izolovaná DNA molekula kóduje bílkovinu, mající hematopoetickou aktivitu.

19. Izolovaná polynukleotidová molekula podle nároku 18, přičemž řečená molekula kóduje polypeptid, jenž obsahuje aminokyselinovou sekvenci Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196.

20. Vektor exprese, jenž obsahuje následující funkčně spojené prvky:

promotor transkripce;

úsek DNA, vybraný ze skupiny zahrnující

a) úsek DNA kódující hematopoetickou bílkovinu a obsahující nukleotidovou sekvenci jak je ukázána ve Vzorci III od nukleotidu 237 po nukleotid 692;

b) úsek DNA kódující hematopoetickou bílkovinu a obsahující nukleotidovou sekvenci jak je ukázána ve Vzorci IV od nukleotidu 64 po nukleotid 519;

PRŮMYSLOVĚ VLASTNĚNÝ	U P R A D U	30. 7.	113352	č.j.
PŘÍL.	%	identická	2	

c) alelické varianty a) nebo b), a  
d) DNA úseky kódující hematopoetickou  
své aminokyselinové sekvenci alespoň  
s bílkovinou kódovanou a), b) nebo c); a  
transkripční terminátor.

21. Vektor exprese podle nároku 20, přičemž řečený úsek DNA kóduje hematopoetickou bílkovinu, jež je v aminokyselinové sekvenci alespoň z 90 % identická s bílkovinami kódovanými v a), b) nebo c).

22. Vektor exprese podle nároku 20, přičemž řečený úsek DNA zahrnuje nukleotid 237 až nukleotid 722 ze Vzorce III nebo nukleotid 64 až nukleotid 525 ze Vzorce IV.

23. Vektor exprese podle nároku 20 obsahující dále sekvenci signálu sekrece funkčně spojenou s řečeným úsekem DNA.

24. Způsob přípravy hematopoetické bílkoviny v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kultivaci buněk, do nichž byl zaveden vektor exprese podle nároku 20, přičemž řečené buňky exprimují hematopoetickou bílkovinu kódovanou řečeným úsekem DNA a získání hematopoetické bílkoviny.

25. Způsob přípravy hematopoetické bílkoviny podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hematopetická bílkovina je řečenými buňkami secernována a je získávána z média, v němž se řečené buňky kultivují.

26. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje bílkovinu podle nároku 1 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

27. Protilátka, jež se váže k epitopu bílkoviny podle nároku 1.

28. Sonda, která obsahuje oligonukleotid o alespoň 14 nukleotidech, přičemž sekvence řečeného oligonuklotidu je alespoň

z 80 % identická k části o stejné délce z

- a) Vzorce III
- b) Vzorce IV
- c) Vzorce V
- d) sekvencí komplementárních k sekvencím Vzorce III, Vzorce IV nebo Vzorce V

29. Způsob pro detekci DNA molekuly, kódující trombopoietin, ve směsi DNA molekul, vyznačující se tím, že zahrnuje sondování směsi DNA molekul sondou, která obsahuje oligonukleotid o alespoň 14 nukleotidech, přičemž sekvence řečeného oligonukleotidu je alespoň z 80 % identická k části o stejné délce z

- a) Vzorce III
- b) Vzorce IV
- c) Vzorce V
- d) sekvencí komplementárních k sekvencím Vzorce III, Vzorce IV nebo Vzorce V

a detekci DNA molekul, s nimiž řečená sonda hybridizuje.

30. Způsob stimulace buněčné proliferace vyznačující se tím, že se ke kultivovaným buňkám kostní dřene in vitro přidává izolovaná bílkovina podle nároku 1 v množství postačujícím ke stimulaci buněčné proliferace.

31. Způsob podle nároku 30 vyznačující se tím, že řečené buňky jsou megakaryocyty nebo prekursori megakaryocytů.

32. Způsob čištění trombopoietinu vyznačující se tím, že obsahuje  
vystavení roztoku obsahujícího trombopoietin protilátce navázané na pevnou podložku, přičemž řečená protilátka se váže k epitopu bílkoviny podle nároku 1,  
promytí řečené protilátky k odstranění nenavázaných kontaminujících látek,  
eluci navázaného trombopoietinu z řečené protilátky, a  
získání eluovaného trombopoietinu.

34<sup>3</sup>. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje bílkovinu podle nároku 1 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

35<sup>4</sup>. Protilátka, jež se váže k epitopu bílkoviny podle nároku 1.

36<sup>5</sup>. Způsob stimulace tvorby krevních destiček u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e řečenému savci se podává terapeuticky účinné množství hematopoetické bílkoviny, vybrané ze skupiny sestávající z

a) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce I od aminokyselinového zbytku 45 po aminokyselinový zbytek 196;

c) bílkovin obsahujících sekvenci aminokyselin Vzorce II od aminokyselinového zbytku 22 po aminokyselinový zbytek 173;

c) alelických variant a) nebo b), a

d) druhových homologů a), b), nebo c),

příčemž řečená bílkovina stimuluje proliferaci a diferenciaci myeloidních nebo lymfoidních prekursorů, v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem.

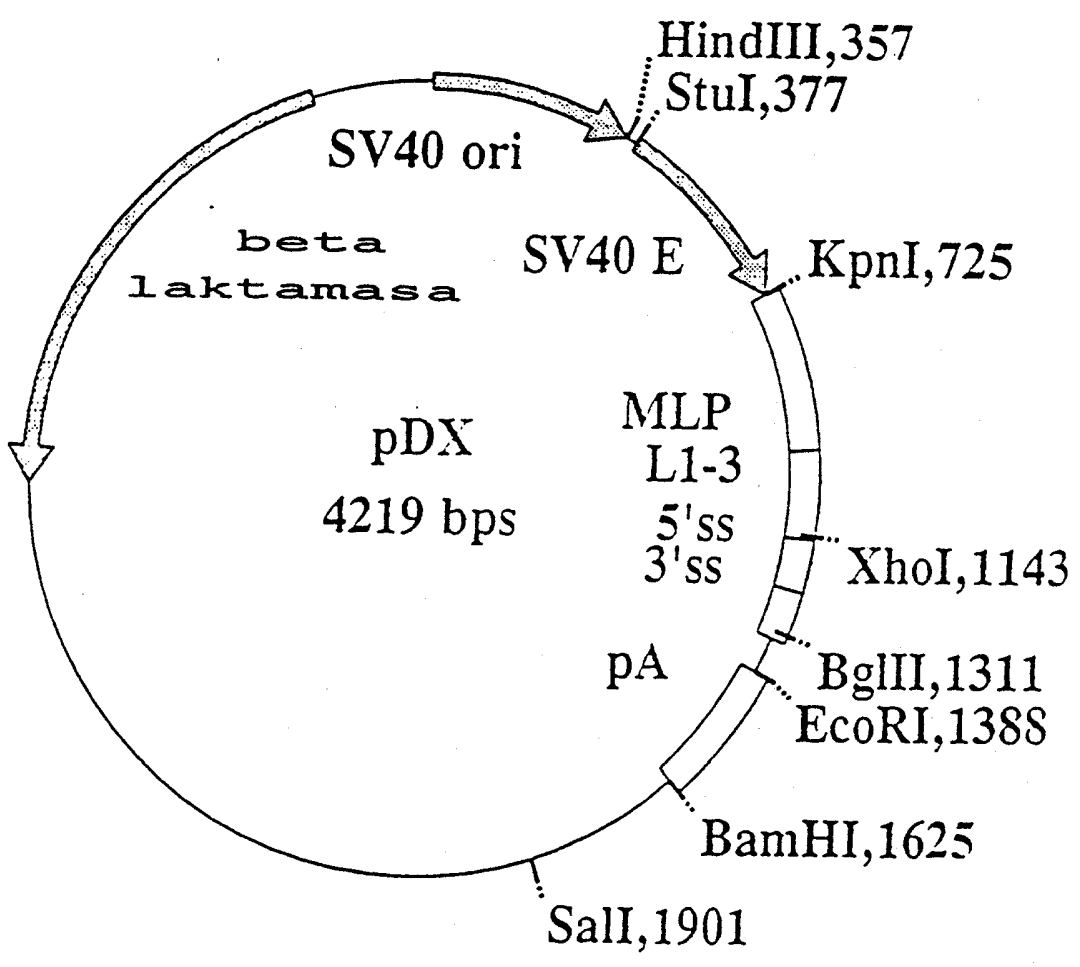
37<sup>6</sup>. Sonda, která obsahuje oligonukleotid o alespoň 14 nukleotidech, přičemž sekvence řečeného oligonuklotidu je alespoň z 80 % identická k části o stejné délce z

a) Vzorce III

b) Vzorce IV

c) Vzorce V

d) sekvencí komplementárních k sekvencím Vzorce III, Vzorce IV nebo Vzorce V



Obr. 1



Obr. 2

