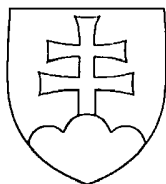


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 08.03.95
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/207 412
(32) Dátum priority: 08.03.94
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 08.01.97
(86) Číslo PCT: PCT/US95/02950, 08.03.95

(21) Číslo dokumentu:

1129-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07H 21/00

A 61K 38/18

C 07K 14/50

(71) Prihlasovateľ: HUMAN GENOME SCIENCES, INC., Rockville, MD, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Hu Jing-Shan, Gaithersburg, MD, US;
Gocayne Jeannine, D., Silver Spring, MD, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Fibroblastový rastový faktor-10**

(57) Anotácia:

Sú opísané ľudské polypeptidy FGF-10 a DNA (RNA) kódujúca tieto polypeptidy FGF-10, postup výroby týchto peptidov rekombinačnými metódami, spôsoby použitia tohto polypeptidu na stimuláciu revaskularizácie, na ošetrovanie rán a na prevenciu neuronálneho poškodenia, antagonisty proti týmto polypeptidom a ich použitie ako terapeutických prostriedkov na prevenciu abnormálnej proliferácie buniek, hypervaskulárnych ochorení a proliferácie epiteliálnych buniek šošovky, diagnostické spôsoby detekcie mutácií v kódujúcej sekvencii FGF-10 a zmien koncentrácie proteínu FGF-10 vo vzorke získanej od hostiteľa.

Fibroblastový rastový faktor-10

Oblasť techniky

Vynález sa týka novo identifikovaných polynukleotidov, polypeptidov kódovaných týmito polynukleotidmi, použitia týchto polynukleotidov a polypeptidov a výroby týchto polynukleotidov a polypeptidov. Polypeptidy podľa vynálezu sú konkrétne fibroblastový rastový faktor-10/heparín viažuci rastový faktor-10, ďalej označované ako „FGF-10“. Vynález sa tiež týka inhibície pôsobenia týchto polypeptidov.

Doterajší stav techniky

Fibroblastové rastové faktory sú skupina proteínov, charakteristických väzbou na heparín, a preto sa tiež nazývajú heparín viažuce rastové faktory (HBGF). Expresia rôznych týchto proteínov bola zistená v rôznych tkanivách a dochádza k nej pod zvláštnou časovou a priestorovou kontrolou. Tieto proteíny sú účinnými mitogénmi pre rôzne bunky mezodermálneho, ektodermálneho a endodermálneho pôvodu, zahrnujúce fibroblasty, korneálne a vaskulárne endoteliálne bunky, granulocyty, adrenálne kortikálne bunky, chondrocyty, myoblasty, bunky vaskulárneho hladkého svalstva, epiteliálne bunky šošovky, melanocyty, keratinocyty, oligodendrocyty, astrocyty, osteoblasty a hematopoietické bunky.

Každý z týchto proteínov má funkcie prekrývajúce sa s inými a tiež svoje jedinečné spektrum funkcií. Okrem schopnosti stimulovať proliferáciu vaskulárnych endoteliálnych buniek je ako FGF-1, tak FGF-2 chemotaktický pre endoteliálne bunky a u FGF-2 sa zistilo, že umožňuje endoteliálnym bunkám prenikať základovou membránou. V súlade s týmito vlastnosťami má FGF-1 i FGF-2 schopnosť stimulovať angiogéniu. Ďalším významným rysom týchto rastových faktorov je ich schopnosť podporovať hojenie rán. Mnoho ďalších členov skupiny FGF zdieľa s FGF-1 a FGF-2 podobné účinky, ako je podpora angio-

genézie a hojenie rán. U niektorých členov génovej rodiny FGF sa ukázalo, že indukujú tvorbu mezodermu a modulujú diferenciáciu neurónových buniek, adipocytov a buniek kostrového svalstva.

Okrem týchto biologických aktivít v normálnych tkanivách sa proteíny FGF zúčastňujú podpory tumorigenézie v karcinómoch a sarkómoch podporovaním vaskularizácie nádorov a ako transformujúce proteíny, ak je ich expresia deregulovaná.

Skupina FGF v súčasnej dobe pozostáva z ôsmich štruktúrne príbuzných polypeptidov. Gény pre každý z nich boli klonované a sekvenované. Dva z členov, FGF-1 a FGF-2, boli charakterizované pod rôznymi názvami, ale najčastejšie ako bázický, resp. kyslý fibroblastový rastový faktor. Normálne génové produkty ovplyvňujú všeobecnú proliferačnú schopnosť väčšiny buniek odvodených od mezodermu a neuroektodermu. Sú schopné indukovať angiogenéziu *in vivo* a môžu hrať významnú úlohu v rannom vývoji (Burgess, W.H. a Maciag, T., *Annu. Rev. Biochem.*, 58:575-606 (1989)).

Eukaryotický expresný vektor, kódujúci vylučovanú formu FGF-1, bol zavedený génovým prenosom do prasačích tepien. Tento model definuje funkciu génu v arteriálnej stene *in vivo*. Expresia FGF-1 vyvolala v prasačích tepnách 21 dní po génovom prenose intimálne zosilnenie (Nabel, E.G., a d., *Nature*, 362:844-6 (1993)). Ďalej bolo demonštrované, že bázický fibroblastový rastový faktor môže regulovať rast a progresiu gliómov nezávisle na svojej úlohe pri angiogenézi nádorov a že toto pôsobenie môže vyžadovať uvoľňovanie alebo vylučovanie bázického fibroblastového rastového faktoru (Morrison, R.S. a d., *J. Neurosci. Res.*, 34:502-9 (1993)).

Fibroblastové rastové faktory, ako je bázický FGF, sa ďalej zúčastňujú rastu buniek Kaposiho sarkómu *in vitro* (Huang, Y.Q., a d., *J. Clin. Invest.*, 91:1191-7 (1993)). Ďalej bola sekvencia cDNA, kódujúca ľudský bázický fibroblastový rastový faktor, klonovaná za transkripčný promótor, rozpoznávaný RNA polymerázou bakteriofága T7. Bolo zistené, že takto získané bázické fibroblastové rastové faktory majú v testoch mitogenicity, syntézy plazminogé-

nového aktivátoru a angiogenézie biologickú aktivitu nerozlišiteľnú od ľudského placentárneho fibroblastového rastového faktoru (Squires, C.H., a d., J. Biol. Chem. 263:16297-302 (1988)).

Patent US 5,155,214 opisuje v podstate čisté cicavčie bázické fibroblastové rastové faktory a ich výrobu. Je uvedená sekvencia aminokyselín hovädzieho a ľudského bázického fibroblastového rastového faktoru, rovnako ako sekvencia DNA, kódujúca polypeptid hovädzieho faktoru.

Polypeptid podľa vynálezu bol predbežne identifikovaný ako člen skupiny FGF v dôsledku homológie sekvencie aminokyselín s ostatnými členmi skupiny FGF.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu sú nové maturované polypeptidy, tvorené FGF-10 a jeho biologicky aktívnymi a diagnosticky alebo terapeuticky použiteľnými fragmentami, analógmi a derivátmi. Polypeptidy podľa vynálezu sú ľudského pôvodu.

Predmetom vynálezu sú tiež izolované molekuly nukleových kyselín kódujúce FGF-10, zahrnujúce mRNA, DNA, cDNA, genómovú DNA a ich antimediatorové analógy a biologicky aktívne a diagnosticky alebo terapeuticky využiteľné fragmenty.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob výroby takéhoto polypeptidu rekombinačnými metódami s použitím rekombinačných vektorov, ako sú klonovacie a expresné plazmidy, použiteľné pri rekombinačnej výrobe proteínov FGF-10, a rekombinačných prokaryotických a/alebo eukaryotických hostiteľských buniek zahrnujúcich sekvenciu nukleovej kyseliny ľudského FGF-10.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob použitia takéhoto polypeptidu alebo polynukleotidu kódujúceho taký peptid na terapeutické účely, napríklad na podporu hojenia rán, popálenín a vredov, na prevenciu neuronálneho poško-

denia v dôsledku neuronálnych porúch a na prevenciu starnutia pokožky a úbytku vlasov.

Ďalej sú predmetom vynálezu protilátky proti týmto polypeptidom.

Ďalej sú predmetom vynálezu antagonisti proti týmto polypeptidom, ktorých je možné použiť na inhibíciu pôsobenia takého polypeptidu, napríklad pri liečbe nádorov a hypervaskulárnych ochorení.

Ďalej sú predmetom vynálezu sondy nukleových kyselín, zahrnujúce molekuly nukleových kyselín s dostatočnou dĺžkou pre špecifickú hybridizáciu so sekvenciami ľudského FGF-10.

Ďalej sú predmetom vynálezu diagnostické testy na detekciu ochorení alebo náchylnosti k ochoreniam, súvisiacich s mutáciami sekvencií nukleových kyselín FGF-10 alebo s hyperexpresiou polypeptidov kódovaných týmito sekvenciami.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob použitia týchto polypeptidov alebo polynukleotidov kódujúcich tieto polypeptidy pre účely *in vitro*, súvisiace s vedeckým výskumom, syntézou DNA a výrobou vektorov DNA.

Vynález sa v jednom aspekte týka izolovaných molekúl nukleových kyselín (polynukleotidov), ktoré kódujú maturovaný polypeptid, ktorého odvodená sekvencia aminokyselín je zobrazená na obr. 1 (SEQ ID NO 2), alebo maturovaný polypeptid kódovaný cDNA klonu uloženého 4.3.1994 u ATCC pod číslom 75696.

Polynukleotid podľa vynálezu bol objavený najskôr v knižnici cDNA, odvodenej od 8týždňového ľudského tkaniva ranného štádia a potom bola nájdená cDNA s plnou dĺžkou v knižnici odvodenej od ľudskej mandle. Je štruktúrne príbuzný všetkým členom rodiny génov fibroblastového rastového faktoru a obsahuje otvorený čítací rámec kódujúci polypeptid so 181 aminokyselinami. Medzi vrcholné zhody patrí: 1) 37% identita a 67% sekvenčná podobnosť s FGF-9, izolovaným z mozgu, v úseku 129 aminokyselín; 2) 36% identita a 64% podob-

nosť s FGF-7 (keratinocytový rastový faktor) v oblasti 121 aminokyselín; 3) 33% identita a 55% podobnosť s FGF-1 (kyslý FGF) v úseku 110 aminokyselín. Okrem toho je v polypeptide podľa vynálezu zachovaná signatúra skupiny FGF/HBGF, tj. GXLX(S,T,A,G)X6(D,E)CXFXE (X znamená zvyšok ktorejkoľvek aminokyseliny, (D,E) znamená buď zvyšok D alebo E, X6 znamená 6 akýchkoľvek zvyškov aminokyselín).

Polynukleotid podľa vynálezu môže byť vo forme RNA alebo vo forme DNA, pričom DNA zahŕňa cDNA, genómovú DNA a syntetickú DNA. DNA môže byť dvojreťazcová alebo jednoreťazcová. Kódujúca sekvencia, ktorá kóduje maturovaný polypeptid, môže byť identická s kódujúcou sekvenciou uvedenou na obr. 1 (SEQ ID NO 1) alebo s kódujúcou sekvenciou uloženého klonu, alebo to môže byť odlišná kódujúca sekvencia v dôsledku repetície alebo degenerácie genetického kódu, ktorá kóduje ten istý maturovaný polypeptid ako DNA na obr. 1 (SEQ ID NO 1) alebo uložená cDNA.

Polynukleotid, ktorý kóduje maturovaný polypeptid podľa obr. 1 (SEQ ID NO 2) alebo maturovaný polypeptid kódovaný uloženou cDNA, môže zahŕňať: iba kódujúcu sekvenciu pre maturovaný polypeptid; kódujúcu sekvenciu pre maturovaný polypeptid a ďalšiu kódujúcu sekvenciu, ako je vedúca alebo sekrečná sekvencia alebo sekvencia proteínu; kódujúcu sekvenciu pre maturovaný polypeptid (a popri prípade ďalšiu kódujúcu sekvenciu) a nekódujúcu sekvenciu, ako sú intróny alebo nekódujúce sekvencie 5' a/alebo 3' kódujúce sekvencie pre maturovaný polypeptid.

Výraz „polynukleotid kódujúci polypeptid“ zahŕňa polynukleotid, ktorý obsahuje iba kódujúcu sekvenciu pre polypeptid, rovnako ako polynukleotid, ktorý obsahuje ďalšiu kódujúcu a/alebo nekódujúcu sekvenciu.

Predmet vynálezu sa ďalej týka variantov vyššie opísaných polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty, analógy a deriváty polypeptidu, majúceho odvodenú sekvenciu aminokyselín podľa obr. 1 (SQ ID NO 2), alebo polypeptidu kódovaného cDNA uloženého klonu. Variantmi polynukleotidu môžu byť priro-

dzene sa vyskytujúce alelické varianty polynukleotidu alebo varianty polynukleotidu, prirodzene sa nevyskytujúce.

Vynález teda zahrnuje polynukleotidy kódujúce ten istý maturovaný polypeptid, aký je znázornený na obr. 1 (SEQ ID NO 2), alebo ten istý maturovaný polypeptid, aký je kódovaný cDNA uloženého klonu, rovnako ako varianty týchto polynukleotidov, ktoré kódujú fragment, derivát alebo analóg polypeptidu podľa obr. 1 (SEQ ID NO 2) alebo polypeptid kódovaný cDNA uloženého klonu. Také nukleotidové varianty zahrnujú delečné, substitučné a adičné alebo inzerčné varianty.

Ako je vyššie uvedené, polynukleotid môže mať kódujúcu sekvenciu, ktorou je prirodzene sa vyskytujúci alelický variant kódujúcej sekvencie znázornenej na obr. 1 (SEQ ID NO 1) alebo kódujúcej sekvencie uloženého klonu. Ako je známe, alelický variant je alternatívna forma polynukleotidovej sekvencie, ktorá môže mať substitúciu, deléciu alebo adíciu jedného alebo viac nukleotidov, ktorá podstatne nemení funkciu kódovaného polypeptidu.

Vynález zahrnuje tiež polynukleotidy, kde môže byť kódujúca sekvencia maturovaného polypeptidu fúzovaná v tom istom čítacom rámci s polynukleotidovou sekvenciou, ktorá napomáha expresii a sekrécii polypeptidu z hostiteľskej bunky, napríklad s vedúcou sekvenciou, ktorá funguje ako sekrečná sekvencia pre kontrolu transportu polypeptidu z bunky. Polypeptid majúci vedúcu sekvenciu je preproteín a jeho vedúca sekvencia môže byť odštiepená hostiteľskou bunkou za vzniku maturovanej formy polypeptidu. Polynukleotidy môžu tiež kódovať proproteín, ktorým je maturovaný proteín plus pridané 5'-aminokyselinové zvyšky. Maturovaný proteín, ktorý má prosekvenciu, je proproteín a jedná sa o inaktívnu formu proteínu. Akonáhle je prosekvencia odštiepená, zostáva aktívny maturovaný proteín.

Polynukleotid podľa vynálezu teda napríklad môže kódovať maturovaný proteín alebo proteín s prosekvenciou alebo proteín s prosekvenciou i presekvenciou (vedúcou sekvenciou).

Polynukleotidy podľa vynálezu môžu mať tiež kódujúcu sekvenciu, fúzovanú v rámci s markerovou sekvenciou, ktorá umožňuje čistenie polypeptidu podľa vynálezu. Markerovou sekvenciou môže byť hexahistidínový úsek, dodaný vektorom pQE-9, umožňujúci čistenie maturovaného polypeptidu, fúzovaného s markerom, v prípade bakteriálneho hostiteľa, alebo napríklad môže byť markerovou sekvenciou hemaglutinínový (HA) úsek, ak sa používa cicavčí hostiteľ, napríklad bunky COS-7. Marker HA zodpovedá epitopu, odvodenému od proteínu chrípkového hemaglutinínu (Wilson, I., a d., Cell, 37:767 (1984)).

Vynález sa ďalej týka polynukleotidov, ktoré hybridizujú s vyššie opísanými sekvenciami, ak je medzi sekvenciami aspoň 50%, prednostne 70% identita. Vynález sa predovšetkým týka polynukleotidov, ktoré hybridizujú s vyššie opísanými polynukleotidmi pri striktných podmienkach. Výraz „striktné podmienky“ tu znamená, že k hybridizácii dôjde iba pri aspoň 95%, prednostne aspoň 97% identite medzi sekvenciami. Polynukleotidy, ktoré hybridizujú s vyššie opísanými polynukleotidmi vo výhodnom uskutočnení, si uchovávajú v podstate rovnakú biologickú funkciu alebo aktivitu, ako maturovaný polypeptid kódovaný cDNA podľa obr. 1 (SEQ ID NO 1) alebo uloženou cDNA.

Uvádzané uložené vzorky budú uchovávané podľa Budapeštianskej zmluvy o medzinárodnom uznávaní uloženia mikroorganizmov na účely patentového konania. Tieto vzorky sú uložené iba pre pohodlnosť a nepredstavujú pripustenie, že by uloženie bolo nutné podľa § 112 USC 35. Sekvencie polynukleotidov obsiahnutých v uložených materiáloch, rovnako ako sekvencie aminokyselín polypeptidov, ktoré sú nimi kódované, sú tu zahrnuté formou odkazu a sú rozhodujúce v prípade akéhokoľvek konfliktu s tu uvedeným popisom sekvencií. Na výrobu, použitie alebo predaj uložených materiálov môže byť vyžadovaná licencia a týmto sa žiadna taká licencia neudeľuje.

Vynález sa ďalej týka polypeptidu FGF-10, ktorý má odvodenú sekvenciu aminokyselín podľa obr. 1 (SEQ ID NO 2) alebo ktorý má sekvenciu aminokyselín kódovanú uloženou cDNA, rovnako ako fragmentov, analógov a derivátov takéhoto polypeptidu.

Výrazy „fragment“, „derivát“ a „analóg“ s odkazom na polypeptid podľa obr. 1 (SEQ ID NO 2) alebo polypeptid kódovaný uloženou cDNA znamenajú polypeptid, ktorý si uchováva v podstate rovnakú biologickú funkciu alebo aktivitu ako tento polypeptid. Analóg teda zahrnuje proproteín, ktorý môže byť aktivovaný odštiepením proproteínovej časti za vzniku aktívneho maturovaného polypeptidu.

Polypeptidom podľa vynálezu môže byť rekombinačný polypeptid, prírodný polypeptid alebo syntetický polypeptid, prednostne rekombinačný polypeptid.

Fragment, derivát alebo analóg polypeptidu podľa obr. 1 (SEQ ID NO 2) alebo polypeptidu kódovaného uloženou cDNA môže byť

(i) taký, v ktorom je jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov nahradené konzervatívnym alebo nekonzervatívnym aminokyselinovým zvyškom (prednostne konzervatívnym aminokyselinovým zvyškom) a týmto dosadeným aminokyselinovým zvyškom môže alebo nemusí byť zvyšok kódovaný genetickým kódom, alebo

(ii) taký, v ktorom jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov obsahuje substituentovú skupinu, alebo

(iii) taký, v ktorom je maturovaný polypeptid fúzovaný s inou zlúčeninou, ako je zlúčenina zvyšujúca polčas polypeptidu (napríklad polyetylén glykol), alebo

(iv) taký, v ktorom sú k maturovanému peptidu fúzované ďalšie aminokyseliny, ako je vedúca alebo sekrečná sekvencia alebo sekvencia, ktorá sa používa na čistenie maturovaného polypeptidu alebo proproteínovej sekvencie. Tieto fragmenty, deriváty a analógy sa považujú za spadajúce do rozsahu znalostí odborníka na základe tu uvedených údajov.

Polypeptidy a polynukleotidy podľa vynálezu sa prednostne vyskytujú v izolovanej forme a prednostne sú čistené do homogenity.

Výraz „izolovaný“ znamená, že materiál je oddelený od svojho pôvodného prostredia (napríklad prirodzeného prostredia, ak sa vyskytuje prirodzene). Napríklad prirodzene sa vyskytujúci polynukleotid alebo polypeptid prítomný v živom živočíchovi sa neizoluje, ale ten istý polynukleotid alebo DNA alebo polypeptid, oddelený od niektorých alebo všetkých sprievodných materiálov v prirodzenom systéme, sa izoluje. Izoluje sa aj v prípade, že je polynukleotid súčasťou vektoru a/alebo keď je polynukleotid alebo polypeptid súčasťou zmesi, pretože taký vektor alebo zmes nie je súčasťou jeho prirodzeného prostredia.

Vynález sa týka tiež vektorov, ktorá zahŕňujú polynukleotidy podľa vynálezu, hostiteľských buniek, ktoré sú podrobené genetickej manipulácii pomocou vektorov podľa vynálezu a výroby polypeptidov podľa vynálezu rekombinačnými metódami.

Hostiteľské bunky môžu byť podrobené genetickej manipulácii (transdukcií alebo transformácii alebo transfekcií) pomocou vektorov podľa vynálezu, ktorými môžu byť napríklad klonovacie vektory alebo expresné vektory. Vektor môže byť napríklad vo forme plazmidu, vírusovej častice, fága atď. Takto manipulované hostiteľské bunky môžu byť kultivované v konvenčnom živnom médiu, príslušne modifikovanom pre aktiváciu promótorov, selekciu transformantov alebo amplifikáciu génov FGF-10. Podmienky kultivácie, ako je teplota, pH apod., sú rovnaké, aké boli použité u hostiteľskej bunky zvolenej pre expresiu, a sú bežnému odborníkovi zrejmé.

Polynukleotid podľa vynálezu môže byť použitý na výrobu peptidu rekombinačnými metódami. Napríklad polynukleotidová sekvencia môže byť zahrnutá do jedného z rôznych expresných médií, predovšetkým vektorov alebo plazmidov pre expresiu polypeptidu. Tieto vektory zahŕňujú chromozomálne, nechromozomálne a syntetické sekvencie DNA, napríklad deriváty SV40; bakteriálne plazmidy; fágovú DNA; kvasinkové plazmidy; vektory odvodené od kombinácií plazmidov a fágovej DNA, vírusovú DNA, ako je vírus vakcinie, adenovírus, vírus hydínových kiahní a pseudorabies. Je však možné použiť aj akýkoľvek

iný vektor alebo plazmid, pokiaľ sú v hostiteľovi replikovateľné a životaschopné.

Príslušné sekvencie DNA môžu byť do vektoru vložené rôznymi postupmi. Všeobecne sa sekvencia DNA vkladá známymi postupmi do príslušných miest reštrikčných endonukleáz. Tieto a ďalšie postupy spadajú do rozsahu znalostí odborníka.

Sekvencia DNA v expresnom vektore je operatívne naviazaná k príslušnej riadiacej sekvencii(iám) (promótoru) pre riadenie syntézy mRNA. Ako príklady takýchto promótorov je možné uviesť promótor LTR alebo SV40, lac alebo *trp* *E. coli*, promótor P_L fága lambda a ďalšie promótory, o ktorých je známe, že riadia expresiu génov v prokaryotických alebo eukaryotických bunkách alebo ich vírusoch. Expresný vektor obsahuje tiež miesto väzby ribozómov pre iniciáciu translácie a terminátor transkripcie. Vektor môže tiež obsahovať príslušné sekvencie pre amplifikačnú expresiu.

Expresné vektory ďalej prednostne obsahujú gén poskytujúci fenotypický rys pre selekciu transformovaných hostiteľských buniek, ako je dihydrofolát reductáza alebo neomycínová rezistencia pre eukaryotickú bunkovú kultúru alebo tetracyklínová alebo ampicilínová rezistencia v *E. coli*.

Vektor, obsahujúci vyššie opísanú príslušnú sekvenciu DNA rovnako ako príslušný promótor alebo riadiacu sekvenciu, môže byť použitý na transformáciu vhodného hostiteľa, a tak umožniť expresiu proteínu hostiteľom. Ako príklady vhodných hostiteľov je možné uviesť bakteriálne bunky, ako je *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; bunky plesní, ako sú kvasinky; hmyzie bunky, ako je *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sf9; zvieracie bunky, ako sú CHO, COS alebo Bowesov melanóm; adenovírusy, rastlinné bunky atď. Výber vhodného hostiteľa sa považuje za zrejmý pre odborníka na základe tu uvedených údajov.

Vynález konkrétne tiež zahŕňa rekombinačné konštrukty, zahrnujúce jednu alebo viac vyššie podrobne opísaných sekvencií. Konštrukty obsahujú vektor, ako je plazmid alebo vírusový vektor, do ktorého bola vložená sekvencia

podľa vynálezu v priamej alebo spätnej orientácii. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu konštrukt ďalej obsahuje regulačné sekvencie, zahrnujúce napríklad promótor, operatívne viazaný k sekvencii. Odborníkovi sú známe a obchodne sú dostupné rôzne vhodné vektory a promótory. Ako príklady sa uvádzajú tieto vektory: Bakteriálne: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryotické: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Môžu však byť použité akékoľvek ďalšie vektory alebo plazmidy, pokiaľ sú v hostiteľovi replikovateľné a životaschopné.

Promótorové oblasti môžu byť z ktoréhokolvek požadovaného génu selektované pomocou vektorov CAT (chloramfenikol transferáza) alebo iných vektorov so selektovateľnými markermi. Dvoma vhodnými vektormi sú pKK232-8 a pCM7. Konkrétne menovité bakteriálne promótory zahrnujú lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L a trp. Eukaryotické promótory zahrnujú bezprostredný ranný CMV, HSV tymidín kinázu, ranný a neskorý SV40, LTR z retrovírusov a myši metallothioneín-I. Voľba vhodného vektora a promótoru spadá úplne do úrovne bežných znalostí v odbore.

V ďalšom uskutočnení sa vynález týka hostiteľských buniek obsahujúcich vyššie opísaný konštrukt. Hostiteľskou bunkou môže byť vyššia eukaryotická bunka, ako je cicavčia bunka, alebo nižšia eukaryotická bunka, ako je kvasinková bunka, alebo ňou môže byť prokaryotická bunka, ako je bakteriálna bunka. Zavedenie konštrukt do hostiteľskej bunky môže byť uskutočňované transfekciou fosforečnanom vápenatým, transfekciou sprostredkovanou DEAE-Dextranom alebo elektroporáciou (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986)).

Konštrukty v hostiteľských bunkách môžu byť použité bežným spôsobom na výrobu génového produktu kódovaného rekombinačnou sekvenciou. Alternatívne je možné polypeptidy podľa vynálezu vyrábať synteticky pomocou konvenčných peptidových syntetizátorov.

Maturované proteíny môžu byť exprimované v cicavčích bunkách, kvasinách, baktériách alebo ďalších bunkách pod kontrolou príslušných promótorov. Na výrobu týchto proteínov môžu byť tiež použité bezbunkové translačné systémy s použitím RNA, odvodených od konštruktov DNA podľa vynálezu. Vhodné klonovacie a expresné vektory pre použitie v prokaryotických a eukaryotických hostiteľoch sú opísané v Sambrook a d., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, druhé vydanie, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), táto publikácia je tu zahrnutá ako odkaz.

Transkripcia DNA, kódujúca polypeptidy podľa vynálezu, vyššími eukaryotmi, sa zvýši zavedením zosilňovacej (enhancerovej) sekvencie do vektoru. Enhancery sú elementy DNA, pôsobiace v polohe *cis*, obvykle o asi 10 až 300 bp, ktoré pôsobia na promótor za účelom zvýšenia jeho transkripcie. Ako príklady je možné uviesť enhancer SV40 na neskorej strane počiatku replikácie (bp 100 až 270), enhancer ranného promótoru cytomegalovírusu, polyomový enhancer na neskorej strane počiatku replikácie a adenovírusové enhancery.

Rekombinačné expresné vektory všeobecne obsahujú počiatok replikácie a selektovateľné markery, umožňujúce transformáciu hostiteľskej bunky, napríklad gén ampicilínovej rezistencie *E. coli* a gén *S. cerevisiae* TRP1, a promótor odvodený od vysoko exprimovaného génu na riadenie transkripcie štruktúrnej sekvencie v smere expresie. Také promótory môžu byť odvodené od operónov kódujúcich glykolytické enzýmy, ako je medzi inými 3-fosfoglycerát kináza (PGK), faktor α , kyslá fosfatáza alebo proteíny teplotného šoku. Heterológna štruktúrna sekvencia je nastavená do príslušnej fázy s translačnou, iniciačnou a terminačnou sekvenciou. Prípadne môže heterológna sekvencia kódovať fúzny proteín, zahrnujúci N-terminálny identifikačný peptid dodávajúci požadované charakteristiky, napríklad stabilizáciu alebo zjednodušené čistenie exprimovaného rekombinačného produktu.

Vhodné expresné vektory pre bakteriálne použitie sa konštruujú vložením štruktúrnej sekvencie DNA, kódujúcej požadovaný proteín, spolu s vhodnými translačnými, iniciačnými a terminačnými signálmi v operatívne čítacej fáze

s funkčným promótorom. Vektor obsahuje jeden alebo viac fenotypických selektovateľných markerov a počiatok replikácie, aby bolo zaistené zachovanie vektoru, a ak je to žiadúce, dosiahnutá amplifikácia v hostiteľovi. Vhodný prokaryotický hostiteľ pre transformáciu zahŕňujú *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* a rôzne druhy rodov *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Staphylococcus*, avšak je možné podľa potreby voliť aj iné.

Ako neobmedzujúce príklady vhodných expresných vektorov pre bakteriálne použitie je možné uviesť vektory obsahujúce selektovateľný marker a bakteriálny počiatok replikácie, odvodené od komerčne dostupných plazmidov, zahŕňujúcich genetické elementy známeho klonovacieho vektoru pBR322 (ATCC 37017). Také komerčné vektory zahŕňujú napríklad pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko) a GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Tieto „reľazcové“ sekcie pBR322 sú kombinované s príslušným promótorom a štruktúrnou sekvenciou, ktorá má byť exprimovaná.

Po transformácii vhodného hostiteľského kmeňa a kultivácii hostiteľského kmeňa na príslušnú hustotu buniek sa zvolený promótor dereprimuje vhodnými prostriedkami (napríklad zmenou teploty alebo chemickou indukciou) a bunky sa ešte nejakú dobu kultivujú.

Bunky sa izolujú najčastejšie odstredením, rozrušia fyzikálnymi alebo chemickými prostriedkami a vzniknutý surový extrakt sa uchová pre ďalšie čistenie.

Mikrobiálne bunky, používané pri expresii proteínov, môžu byť rozrušené akoukoľvek bežnou metódou, napríklad cyklami zmrazovania a rozmrazovania, sonifikáciou, mechanickým rozrušením alebo použitím lyzačných prostriedkov.

Na expresiu rekombinačného proteínu môžu byť tiež použité rôzne cicavčie bunkové kultivačné systémy. Príklady cicavčích expresných systémov zahŕňujú línie COS-7 opičích ľadvinových fibroblastov, opísané v Gluzman, Cell, 23:175 (1981), a ďalšie bunkové línie schopné expresie kompatibilného vektoru, napríklad bunkové línie C127, 3T3, CHO, HeLa a BHK. Cicavčie expresné vek-

tory obsahujú počiatok replikácie, vhodný promótor a enhancer a tiež všetky potrebné miesta väzby ribozómov, polyadenylačné miesto, miesta donorov a akceptorov zostrihu, terminačné sekvencie transkripcie a 5'-lemujúce neprepísané sekvencie. Na získanie požadovaných neprepísaných genetických elementov je možné použiť sekvenciu DNA, odvodenú od vírusového genómu SV40, napríklad počiatok SV40, ranný promótor, enhancer, zostrih a polyadenylačné miesta.

FGF-10 môže byť z rekombinačných bunkových kultúr izolovaný a čistený doposiaľ známymi metódami, zahrnujúcimi zrážanie síranom amónnym alebo etanolom, kyslú extrakciu, aniónovú alebo kationovú výmennú chromatografiu, chromatografiu na fosfocelulóze, chromatografiu s hydrofóbnou interakciou, afinitnú chromatografiu, hydroxyapatitovú chromatografiu a lektínovú chromatografiu. Je možné použiť stupne opätovného skladania proteínu, ak je to nutné na kompletáciu konfigurácie maturovaného proteínu. Na konečné čistenie je možné použiť vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC).

Polypeptidy podľa vynálezu môžu predstavovať prirodzene čistený produkt alebo produkt chemických syntetických postupov alebo produkt získaný rekombinačnou technológiou z prokaryotického alebo eukaryotického hostiteľa (napríklad bakteriálnymi, kvasinkovými, vyššími rastlinnými, hmyzími a cicavčími bunkami v kultúre). V závislosti na hostiteľovi použitom v rekombinačnej produkčnej technológii môžu byť polypeptidy podľa vynálezu glykosylované cicavčími alebo inými eukaryotickými uhľohydrátmi alebo môžu byť neglykosylované. Polypeptidy podľa vynálezu môžu ďalej obsahovať počiatočný zvyšok aminokyseliny metionínu.

Polypeptid podľa vynálezu môže byť v dôsledku schopnosti stimulovať vaskulárny endoteliálny bunkový rast použitý pri ošetrovaní za účelom stimulácie revaskularizácie ischemických tkanív v prípade rôznych chorobných stavov, ako je trombóza, artérioskleróza a ďalšie kardiovaskulárne choroby.

FGF-10 môže byť tiež použitý na ošetrovanie rán v dôsledku poranení, popálenín, pooperačných opráv tkaniva a vredov, pretože má schopnosť mito-

génne pôsobiť na rôzne typy buniek, ako sú fibroblastové bunky a bunky kostrového svalstva.

FGF-10 môže byť použitý tiež na ošetrovanie a prevenciu neuronálneho poškodenia, ku ktorému dochádza pri určitých neuronálnych poruchách alebo neurovegetatívnych stavoch, ako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a komplex súvisiaci s AIDS. FGF-10 má schopnosť stimulovať rast chondrocytov, a preto môže byť použitý na podporu regenerácie kostí a periodontu a pomáhať pri tkanivových transplantátoch a kostných štepoch.

FGF-10 môže byť tiež použitý na prevenciu starnutia pokožky v dôsledku opaľovania pomocou stimulácie rastu keratinocytov.

FGF-10 môže byť použitý aj na prevenciu úbytku vlasov, pretože aktivuje bunky vlasov a podporuje rast melanocytov. Na rovnakom princípe stimuluje FGF-10 rast a diferenciáciu hematopoietických buniek a buniek kostnej drene, ak je použitý v kombinácii s ďalšími cytokinmi.

FGF-10 môže byť tiež použitý na uchovávanie orgánov pred transplantáciou alebo pre uchovávanie bunkovej kultúry primárnych tkanív.

Vynález sa ďalej týka spôsobu použitia týchto polypeptidov alebo polynukleotidov kódujúcich tieto polypeptidy na účely *in vitro* súvisiace s vedeckým výskumom, syntézou DNA, výrobou vektorov DNA a za účelom získavania diagnostických a terapeutických prostriedkov pre ošetrovanie ľudských ochorení.

Fragmenty plnej dĺžky génu FGF-10 môžu byť použité ako hybridizačná sonda pre knižnicu cDNA za účelom izolácie plnej dĺžky génu FGF-10 a na izoláciu ďalších génov, ktoré s ním majú vysokú sekvenčnú podobnosť alebo ktoré majú podobnú biologickú aktivitu. Sondy tohto typu majú obvykle aspoň 20 báz. Prednostne však sondy obsahujú aspoň 30 báz a obvykle nepresahujú 50 báz, i keď môžu mať i väčší počet báz. Sonda môže byť použitá tiež na identifikáciu klonu cDNA zodpovedajúceho plnej dĺžke transkriptu a genómického klonu alebo klonov, ktoré obsahujú kompletný gén FGF-10 vrátane regulačných a promótorových oblastí, exónov a intrónov. Príkladom screeningu je izolácia

kódujúcej oblasti génu FGF-10 s použitím známej sekvencie DNA na syntézu oligonukleotidovej sondy. Značené oligonukleotidy, majúce komplementárnu sekvenciu k sekvencii génu podľa vynálezu, sa používajú na screening knižnice ľudskej cDNA, genómovej DNA alebo mRNA za účelom zistenia, s ktorými členmi knižnice sonda hybridizuje.

Vynález poskytuje spôsob identifikácie receptorov pre polypeptid FGF-10. Gén kódujúci receptor môže byť identifikovaný rôznymi metódami známymi odborníkom, napríklad vyhľadávaním ligandov a triedením FACS (Coligan a d., *Current Protocols in Immun.*, kapitola 5 (1991)). Ak sa pripravuje polyadenylovaná RNA z bunky zodpovedajúcej polypeptidom, používa sa prednostne expresné klonovanie a knižnica cDNA, vytvorená z tejto RNA, sa rozdelí do súborov a použije na transfekciu buniek COS alebo iných buniek, ktoré nezodpovedajú polypeptidom. Transfikované bunky, ktoré sa pestujú na sklenených podložných sklíčkach, sa vystavia značeným polypeptidom. Polypeptidy môžu byť značené rôznymi prostriedkami, zahrnujúcimi jodáciu alebo zabudovanie rozpoznávacieho miesta pre miestne špecifickú proteínkinázu. Po fixácii a inkubácii sa sklíčka podrobia autorádiografickej analýze. Identifikujú sa pozitívne súbory a pripravia sa podsúbory, ktoré sa retransfikujú s použitím procesu iteratívneho zoskupovania a rescreeningu, čím sa nakoniec získa jednotlivý klon, ktorý kóduje predpokladaný receptor.

Ako alternatívny prístup k identifikácii receptorov môžu byť značené polypeptidy fotoafinitne naviazané na bunkovú membránu alebo extraktové preparáty, ktoré exprimujú receptorovú molekulu. Zosietený materiál sa rozštiepi pomocou analýzy PAGE a vytaví röntgenovému filmu. Značený komplex, obsahujúci receptory polypeptidov, môže byť vyrezaný, rozštiepený na peptidové fragmenty a podrobený mikrosekvenovaniu proteínov. Sekvencia aminokyselín, získaná mikrosekvenovaním, sa použije na konštrukciu sady degenerovaných oligonukleotidových sond pre screening knižnice cDNA za účelom identifikácie génov kódujúcich predpokladané receptory.

Vynález poskytuje spôsob screeningu za účelom identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú pôsobenie FGF-10. Príklad takého testu zahrnuje kombináciu cicavčej fibroblastovej bunky, FGF-10, zlúčeniny podrobovanej screeningu a $^3\text{[H]}$ -tymidínu za podmienok bunkovej kultivácie, za ktorých by fibroblastová bunka normálne proliferovala. Je možné uskutočniť kontrolný test v neprítomnosti zlúčeniny podrobovanej screeningu a porovnať s veľkosťou proliferácie fibroblastov v prítomnosti testovanej zlúčeniny za účelom stanovenia, či zlúčenina stimuluje proliferáciu keratinocytov stanovením príjmu $^3\text{[H]}$ tymidínu v oboch prípadoch.

Za účelom screeningu na antagonistov je možné pripraviť rovnaký test a meria sa schopnosť zlúčeniny brániť proliferácii fibroblastov a vykoná sa stanovenie antagonistických vlastností. Veľkosť proliferácie fibroblastových buniek sa meria kvapalnou scintilačnou chromatografiou, ktorou sa meria zabudovanie $^3\text{[H]}$ tymidínu.

V inej metóde sa cicavčia bunka alebo membránový preparát, exprimujúci receptor FGF-10, inkubuje so značeným FGF-10 v prítomnosti zlúčeniny. Potom je možné merať schopnosť zlúčeniny podporovať alebo blokovat' túto interakciu. Alternatívne sa meria odpoveď druhého známeho messengerového systému po interakcii FGF-10 a receptoru a porovnáva sa v prítomnosti a neprítomnosti zlúčeniny. Takéto druhé messengerové systémy zahrnujú, bez toho, aby sa na ne obmedzovali, cAMP guanylátcyklázu, iónové kanáliky alebo hydrolýzu fosfoinositidu.

Ako príklady potenciálnych antagonistov FGF-10 je možné uviesť protiľátku alebo v niektorých prípadoch oligonukleotid, ktorý sa viaže na polypeptid. Alternatívne môže byť potenciálnym antagonistom FGF-10 mutantná forma FGF-10, ktorá sa viaže na receptory FGF-10, avšak nie je vyvolaná žiadna odpoveď druhého messengeru, a teda je účinok FGF-10 efektívne blokovaný.

Ďalším potenciálnym antagonistom FGF-10 je antimediatorový konštrukt, pripravený antimediatorovou technológiou. Antimediatorovou technológiou je možné použiť na kontrolu expresie génov prostredníctvom tvorby trojitej špirály

alebo antimediátorovej DNA alebo RNA, obe tieto metódy sú založené na väzbe polynukleotidu na DNA alebo RNA. Napríklad 5'-kódujúca časť polynukleotidovej sekvencie, ktorá kóduje maturované polypeptidy podľa vynálezu, sa použije na konštrukciu antimediátorového oligonukleotidu RNA dĺžky asi 10 až 40 párov báz. Navrhne sa oligonukleotid DNA tak, aby bol komplementárny k oblasti génu, zúčastňujúcej sa transkripcie (trojitá špirála, vid' Lee a d., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney a d., Science, 241:456 (1988); a Dervan a d., Science, 251: 1360 (1991)), a tak bránil transkripcii a produkcii FGF-10. Antimediátorový oligonukleotid RNA hybridizuje *in vivo* s mRNA a blokuje transláciu molekuly mRNA do polypeptidu FGF-10 (proti zmyslu; Okano, J., Neurochem., 56:560 (1991);, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Vyššie opísané oligonukleotidy môžu byť tiež dodané do buniek tak, aby bola *in vivo* exprimovaná antimediátorová RNA alebo DNA na inhibíciu produkcie FGF-10.

Potenciálny antagonista FGF-10 zahrnujú malé molekuly, ktoré sa viažu na väzbové miesta receptora FGF-10 a okupujú ich, a tak spôsobujú neprístupnosť receptora pre FGF-10, takže je zabránené normálnej biologickej aktivite. Príklady malých molekúl zahrnujú, avšak neobmedzujú sa na ne, malé peptidy alebo molekuly podobné peptidom.

Antagonisti FGF-10 sa môžu používať na inhibíciu rastu buniek a proliferčných účinkov FGF-10 na neoplastické bunky a tkanivá, a teda na retardáciu alebo prevenciu abnormálneho rastu a proliferácie buniek, napríklad rastu nádorov.

Antagonisti FGF-10 sa môžu použiť tiež na prevenciu hypervaskulárnych ochorení a na prevenciu proliferácie epiteliálnych buniek šošovky po chirurgii extrakapsulárnej katarakty.

Antagonisti sa môžu používať v zmesi s farmaceuticky prijateľným nosičom, napríklad ďalej opísaným.

Polypeptidy, agonisti a antagonisti podľa vynálezu sa môžu používať v kombinácii s vhodným farmaceutickým nosičom vo forme farmaceutického prípravku. Také prípravky zahrnujú terapeuticky účinné množstvo polypeptidu, agonistov alebo antagonistov a farmaceuticky prijateľný nosič alebo vehikulum. Takýto nosič zahrnuje, avšak neobmedzuje sa na ne, soľný roztok, pufrovaný soľný roztok, dextrózu, vodu, glycerol, etanol a ich kombinácie. Formulácia by mala zodpovedať spôsobu podávania.

Vynález poskytuje tiež farmaceutickú súpravu alebo kit, zahrnujúci jednu alebo viac nádobiek naplnených jednou alebo viac zložkami farmaceutických prípravkov podľa vynálezu. K tejto nádobke (nádobkám) môže byť pripojené oznámenie vo forme predpísanej vládnu agentúrou regulujúcou výrobu, používanie alebo predaj farmaceutických alebo biologických produktov, ktoré odráža súhlas tejto agentúry s výrobou, používaním alebo predajom pre humánne aplikácie. Okrem toho môžu byť polypeptidy, agonisti a antagonisti podľa vynálezu používané v spojení s ďalšími terapeutickými zlúčeninami.

Farmaceutické prípravky môžu byť podávané bežným spôsobom, napríklad orálnou, topickou, intravenóznou, intraperitoneálnou, intramuskulárnou, subkutánnou, intranasálnou alebo intradermálnou cestou. Farmaceutické prípravky sú podávané v množstve, ktoré je účinné pri liečbe a/alebo profylaxii špecifickej indikácie. Všeobecne sa podávajú v množstve aspoň asi 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesnej hmotnosti a vo väčšine prípadov sa podávajú v množstve nepresahujúcom asi 8 mg/kg telesnej hmotnosti za deň. Vo väčšine prípadov je dávkovanie asi 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ až asi 1 mg/kg telesnej hmotnosti denne s prihliadnutím k spôsobu podávania, symptómom atď. V konkrétnom prípade topickej aplikácie sa podávajú prednostne dávky asi 0,1 μg až 9 mg na cm^2 .

Polypeptidy FGF-10 a agonisti a antagonisti, ktorí sú polypeptidmi, môžu byť tiež používané podľa vynálezu expresiou takého polypeptidu *in vivo*, ktorá sa často označuje ako „génová terapia“.

Tak môžu byť bunky napríklad podrobené génovej manipulácii s polynukleotidom (DNA alebo RNA), kódujúcim polypeptid, *ex vivo*, a potom dodané

pacientovi, ktorý má byť liečený týmto polypeptidom. Také metódy sú známe. Bunky môžu byť napríklad podrobené známym spôsobom manipulácii použitím retrovirusovej častice obsahujúcej RNA, kódujúcu polypeptid podľa vynálezu.

Podobne môžu byť bunky manipulované *in vivo* pre expresiu polypeptidu *in vivo*, napríklad známymi metódami. Ako je známe, za účelom manipulácie buniek *in vivo* a expresie polypeptidu *in vivo* môže byť podávaná pacientovi produkčná bunka pre produkciu retrovirusovej častice obsahujúcej RNA, kódujúcej polypeptid podľa vynálezu. Tieto a ďalšie spôsoby podávania polypeptidu podľa vynálezu sú pre odborníka zrejmé z údajov tohto popisu. Napríklad expresné vehikulum pre manipuláciu buniek môže byť iné než retrovirusové častice, napríklad adenovírus, ktorý môže byť použitý na manipuláciu buniek *in vivo* v kombinácii s vhodným nosným vehikulom.

Vynález sa tiež týka použitia génu FGF-10 ako súčasti diagnostického testu na detekciu ochorení alebo náchylnosti k ochoreniam súvisiacim s prítomnosťou mutácií v sekvencii nukleových kyselín FGF-10.

Jednotlivci nesúci mutácie v géne FGF-10 sa môžu detekovať na úrovni DNA rôznymi metódami. Nukleové kyseliny pre diagnózu môžu byť získané z buniek pacienta, napríklad z krvi, moču, slín, materiálu tkaninovej biopsie a autopsie. Genómová DNA môže byť použitá priamo na detekciu alebo môže byť pred analýzou enzymaticky amplifikovaná pomocou PCR (Saiki a d., Nature, 324:163-166 (1986)). Na rovnaký účel môže byť tiež použitá RNA alebo cDNA. Ako príklad môžu byť priméry PCR komplementárne k nukleovej kyseline, kódujúce FGF-10, použité na identifikáciu a analýzu mutácií FGF-10. Delécia a inzercia môžu byť napríklad detekované na základe zmeny veľkosti amplifikovaného produktu oproti normálnemu genotypu. Bodové mutácie môžu byť identifikované hybridizáciou amplifikovanej DNA s RNA rádioznačeného FGF-10 alebo alternatívne s antimediatorovými sekvenciami DNA rádioznačeného FGF-10. Dokonale súhlasiace sekvencie môžu byť od chybných duplexov odlišené digesciou s RNasou A alebo na základe rozdielu teplôt topenia.

Genetické testovanie na základe rozdielov sekvencií DNA môže byť uskutočňované detekciou alebo zmenou elektroforetickej mobility fragmentov DNA v géloch denaturačnými činidlami alebo bez nich. Malé delécie a inzercie v sekvenciách môžu byť vizualizované pomocou gélovej elektroforézy vysokého rozlíšenia. Fragmenty DNA s rôznymi sekvenciami môžu byť rozlíšené na géloch s gradientom denaturujúceho formamidu, na ktorých je mobilita rôznych fragmentov DNA v géle spomalená v rôznych polohách podľa ich konkrétnej teploty topenia alebo čiastočného topenia (vid' napríklad Myers a d., Science, 230:1242 (1985)).

Zmeny sekvencie v konkrétnych miestach je možné tiež odhaliť pomocou testov nukleázovej ochrany, napríklad ochrany RNázy a S1, alebo metódou chemického štiepenia (napríklad Cotton a d., PNAS, USA, 85:4397-4401 (1985)).

Detekciu konkrétnej sekvencie DNA je teda možné uskutočňovať metódami, ako je hybridizácia, ochrana RNázy, chemické štiepenie, priame sekvenovanie DNA alebo použitie reštrikčných enzýmov (napríklad metóda polymorfizmov dĺžok reštrikčných fragmentov, FRLP) a Southernov blotting genómovej DNA.

Okrem bežnejších metód gélovej elektroforézy a sekvenovania DNA je možné mutácie tiež detekovať analýzou *in situ*.

Vynález sa tiež týka diagnostického testu na detekciu pozmenených hladín proteínu FGF-10 v rôznych tkanivách, pretože hyperexpresia proteínov v porovnaní s normálnymi kontrolnými tkanivovými vzorkami môže detekovať prítomnosť ochorenia alebo náchylnosti k ochoreniu, napríklad k nádoru. Testy, používané na detekciu hladiny proteínu FGF-10 vo vzorke získanej od hostiteľa sú odborníkom známe a zahŕňujú rádioimunoanalýzu, testy kompetitívnej väzby, analýzou westernovým prenosom, testy ELISA a „sendvičové“ testy. Test ELISA (Coligan a d., Current Protocols in Immunology, 1(2), kapitola 6, (1991)) zahŕňa najprv prípravu protilátky špecifickej voči antigénu FGF-10, prednostne monoklonálnej protilátky. Ďalej sa pripraví reporterová protilátka k monoklo-

nálnej protilátke. K reporterovej protilátke sa naviaže detekovateľné činidlo, napríklad rádioaktívne, fluorescenčné alebo v tomto prípade enzým chrenová peroxidáza. Z hostiteľa sa odoberie vzorka a inkubuje sa na pevnom nosiči, napríklad na polystyrénovej miske, ktorá viaže proteíny vo vzorke. Všetky voľné väzbové miesta proteínov na miske sa potom pokryjú inkubáciou s nešpecifickým proteínom, ako je bovinný sérový albumín. Potom sa v miske inkubuje monoklonálna protilátka, v priebehu tejto doby sa monoklonálne protilátky naviažu na všetky proteíny FGF-10, naviazané na polystyrénovú misku. Zvyšná nenaviazaná monoklonálna protilátka sa odstráni premytím pufrom. Do misky sa teraz vloží reporterová protilátka, naviazaná na chrenovú peroxidázu, čo vedie k naviazaniu reporterovej protilátky na všetku monoklonálnu protilátku naviazanú na FGF-10. Nenaviazaná reporterová protilátka sa odstráni premytím. Potom sa k miske pridajú peroxidázové substráty a množstvo sfarbenia, vyvinuté za danú dobu, je pri porovnaní so štandardnou krivkou mierou množstva proteínu FGF-10 prítomného v danom objeme pacientovej vzorky.

Je možné použiť kompetitívny test, pri ktorom sa protilátky špecifické k FGF-10 naviažu na pevný nosič a cez pevný nosič sa vedie značený FGF-10 a vzorka získaná od hostiteľa a detekované množstvo značky, napríklad kvapalnou scintilačnou chromatografiou, môže byť korelované s množstvom FGF-10 vo vzorke.

Testu ELISA je podobný „sendvičový“ test. V „sendvičovom“ teste sa FGF-10 vedie cez pevný nosič a viaže sa na protilátku naviazanú na pevný nosič. Na FGF-10 sa potom naviaže druhá protilátka. Potom sa cez pevný nosič vedie tretia protilátka, ktorá je značená a je špecifická k druhej protilátke a ktorá sa viaže na druhú protilátku, a potom je možné kvantifikovať množstvo.

Sekvencie podľa vynálezu sú cenné tiež pre identifikáciu chromozómov. Sekvencia je špecificky cielená na konkrétnu polohu na jednotlivom ľudskom chromozóme a môže s ňou hybridizovať. Navyac existuje v súčasnosti potreba identifikácie konkrétnych miest na chromozóme. Pre označenie polohy na chromozóme je v súčasnosti k dispozícii málo činidiel založených na skutočných sek-

venčných dátach (polymorfizmy repetícií). Mapovanie DNA do chromozómov podľa vynálezu je dôležitým prvým stupňom v korelácii týchto sekvencií s génmi spojenými s určitým ochorením.

Stručne povedané môžu byť sekvencie mapované do chromozómov tak, že sa z cDNA pripraví priméry PCR (prednostne 15 až 25 bp). Použije sa komputrová analýza 3'-nepreloženej oblasti na rýchly výber primérov, ktoré nepresahujú viac než jeden exón v genómovej DNA, a tak komplikujú proces amplifikácie. Tieto priméry sa potom použijú na PCR screening hybridov somatických buniek obsahujúcich jednotlivé ľudské chromozómy. Iba hybridy, obsahujúce ľudský gén zodpovedajúci priméru, poskytnú amplifikovaný fragment.

PCR mapovanie hybridov somatických buniek je rýchly postup na priradenie konkrétnej DNA ku konkrétnemu chromozómu. Použitím vynálezu pre rovnaké oligonukleotidové priméry je možné analogickým spôsobom uskutočniť sublokalizáciu s panelmi fragmentov zo špecifických chromozómov alebo súbory veľkých genómických klonov. Ďalšie stratégie, ktoré je možné použiť podobne na mapovanie do chromozómu, zahŕňujú hybridizáciu *in situ*, prescreening so značenými prietokovo triedenými chromozómami a hybridizačnú preselekciu na konštrukciu knižníc chromozómovo špecifických cDNA.

Na získanie presnej polohy na chromozóme v jednom stupni je možné použiť fluorescenčnú hybridizáciu *in situ* (FISH) klonu cDNA s metafázovým rozšírením chromozómu. Túto metódu je možné použiť už pri dĺžke cDNA iba 500 alebo 600 báz; klony väčšie než 2000 bp však majú vyššiu pravdepodobnosť väzby k jedinej chromozomálnej polohe s dostatočnou intenzitou signálu pre jednoduchú detekciu. FISH vyžaduje použitie klonov, od ktorých bol odvodený úsek expresnej sekvencie (fragment génu podľa vynálezu), a čím dlhších, tým lepšie. Na získanie dobrých výsledkov v rozumnej dobe napríklad stačí 2000 bp, 4000 bp je lepších a viac než 4000 bp pravdepodobne nie je nutných. Popis tejto metódy je možné nájsť vo Verma a d., *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York (1988).

Akonáhle sa sekvencie priradia presnej polohe na chromozóme, je možné fyzickú polohu sekvencie na chromozóme korelovať s údajmi genetickej mapy. (Také údaje sú uvedené napríklad v V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (dostupné on line prostredníctvom John Hopkins University Welch Medical Library)). Vzťah medzi génmi a ochoreniami, ktoré boli mapované do tej istej chromozomálnej oblasti, sa potom identifikuje väzbovou analýzou (spoludedenie fyzicky susediacich génov).

Ďalej je nutné stanoviť rozdiely cDNA alebo genómickej sekvencie medzi postihnutými a nepostihnutými jedincami. Ak je u niektorých alebo všetkých postihnutých jedincov pozorovaná mutácia, ktorá však nie je pozorovaná u žiadneho normálneho jedinca, potom je mutácia pravdepodobne pôvodcom ochorenia.

Pri súčasnom rozlíšení metód fyzikálneho a genetického mapovania môže byť cDNA, presne lokalizovaná do oblasti chromozómu, spojená s ochorením, jedným z 50 až 500 potenciálnych vyvolávajúcich génov. (Z toho vyplýva mapovacie rozlíšenie 1 megabáza a jeden gén na 20 kb.)

Polypeptidy, ich fragmenty alebo iné deriváty alebo ich analógy alebo bunky ich exprimujúce môžu byť použité ako imunogény na vyvolanie tvorby protilátok. Tieto protilátky môžu byť napríklad polyklonálne alebo monoklonálne. Vynález zahrnuje tiež chimerické, jednoreťazcové a humanizované protilátky, rovnako ako fragmenty Fab alebo produkt expresnej knižnice Fab. Na získanie týchto protilátok a fragmentov je možné použiť rôzne známe postupy.

Protilátky vytvorené proti polypeptidom, zodpovedajúcim sekvencii podľa vynálezu, môžu byť získané priamou injekčnou aplikáciou polypeptidov živočíchovi alebo podaním polypeptidov živočíchovi, prednostne inému než človeku. Takto získaná protilátka potom sama viaže tieto polypeptidy. Týmto spôsobom je možné použiť i sekvencie, kódujúce iba fragment polypeptidov, na vytvorenie protilátok, viažucich celé natívne polypeptidy. Tieto protilátky potom môžu byť použité na izoláciu polypeptidu z tkaniva, ktoré ho exprimuje.

Na prípravu monoklonálnych protilátok je možné použiť akúkoľvek metódu, ktorá poskytuje protilátky produkované kontinuálnymi kultúrami bunkových línií. Príklady techník na získanie monoklonálnych protilátok zahŕňujú metódu hybridomov (Kohler a Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), metódu triomov, metódu hybridomov ľudských B-buniek (Kozbor a d., 1983, Immunology Today 4:72) a metódu EBV-hybridomov na získanie ľudských monoklonálnych protilátok (Cole a d., 1985, v Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., str. 77-96).

Opísané metódy produkcie jednoreťazcových protilátok (patent US 4,946.778) môžu byť upravené na získanie jednoreťazcových protilátok k imunogénnym polypeptidickým produktom podľa vynálezu. Na expresiu humanizovaných protilátok k imunogénnym polypeptidickým produktom podľa vynálezu môžu byť tiež použité transgénne myši.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález je bližšie opísaný v súvislosti s pripojenými výkresmi, ktoré predstavujú konkrétne uskutočnenie vynálezu, avšak neobmedzujú jeho rozsah.

Obr. 1 - zobrazuje sekvenciu cDNA a zodpovedajúcu odvodenú sekvenciu aminokyselín FGF-10. Znáznorná sekvencia aminokyselín reprezentuje maturovanú formu proteínu. Sú použité štandardné jednopísmenové skratky aminokyselín. Sekvenčné nepresnosti sú spoločným problémom pri stanovovaní polynukleotidových sekvencií. Sekvenovanie bolo vykonané pomocou automatického sekvenátoru DNA 373 (Applied Biosystems, Inc.). Sekvenčná presnosť sa predpokladá vyššia než 97 %.

Obr. 2 - znázorňuje homológiu sekvencií aminokyselín medzi FGF-10 a ostatnými členmi skupiny FGF. Konzervatívne aminokyseliny sú vyznačené hrubo.

Obr. 3 - znázorňuje gél SDS-PAGE po transkripcii/translácii proteínu FGF-10.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález je osvetlený na príkladoch uskutočnenia, ktoré ho však nijako neobmedzujú. Všetky diely a množstvá, pokiaľ nie je uvedené inak, sú myslené hmotnostne.

Na uľahčenie pochopenia príkladov sa uvádzajú niektoré často sa vyskytujúce metódy a/alebo výrazy.

„Plazmidy“ sa označujú malým písmenom p, pred ktorým a/alebo za ktorým sú uvedené veľké písmená a/alebo číslice. Tu použité východzie plazmidy sú buď komerčne dostupné, verejne neobmedzene prístupné alebo môžu byť konštruované z dostupných plazmidov publikovanými postupmi. Okrem toho sú v odbore známe a odborníkom sú zrejme ekvivalentné plazmidy.

„Digescia“ DNA označuje katalytické štiepenie DNA reštrikčným enzýmom, ktorý pôsobí iba v niektorých sekvenciách v DNA. Rôzne tu použité reštrikčné enzýmy sú komerčne dostupné a boli použité reakčné podmienky, kofaktory a ďalšie požiadavky, ktoré sú bežnému odborníkovi známe. Na analytické účely sa typicky použije 1 µg plazmidu alebo fragmentu DNA s asi 2 jednotkami enzýmu v asi 20 µl tlmivého roztoku. Za účelom izolácie fragmentov DNA pre konštrukciu plazmidu sa typicky digeruje 5 až 50 µg DNA s 20 až 250 jednotkami enzýmu vo väčšom objeme. Vhodné pufrý a množstvo substrátu pre konkrétne reštrikčné enzýmy uvádza výrobca. Obyčajne sa používa doba inkubácie asi 1 h pri 37 °C, ale podľa pokynov dodávateľa sa môže meniť. Po digescii sa reakčná zmes priamo podrobí elektroforéze na polyakrylamidovom géle za účelom izolácie požadovaného fragmentu.

Delenie odštiepených fragmentov podľa veľkosti sa robí použitím 8 % polyakrylamidového gélu, opísaného v Goeddel, D., a d., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980).

Výraz „oligonukleotidy“ sa vzťahuje buď na jednoreťazcový polydeoxynukleotid alebo na dva komplementárne polydeoxynukleotidové reťazce, ktoré môžu byť syntetizované chemicky. Tieto syntetické oligonukleotidy nemajú 5'-

fosfát, a teda sa neviažu k inému oligonukleotidu bez prídavku fosfátu s ATP v prítomnosti kinázy. Syntetický oligonukleotid sa viaže k fragmentu, ktorý nebol defosforylovaný.

„Ligácia“ označuje proces vytvárania fosfodiesterových väzieb medzi dvoma dvojláknovými fragmentami nukleovej kyseliny (Maniatis, T., a d., tam isto, str. 146). Ak nie je uvedené inak, je možné ligáciu uskutočniť použitím známych pufov a známych podmienok s 10 jednotkami ligázy T4 DNA („ligasa“) na 0,5 µg približne ekvimolárneho množstva spojovaných fragmentov DNA.

Ak nie je uvedené inak, bola transformácia uskutočňovaná spôsobom opísaným v Graham, F., a Van der Eb, A., *Virology*, 52:456-457 (1973).

Príklad 1

Tkanivová distribúcia mRNA FGF-10 v dospelých ľudských tkanivách

Pre analýzu expresie mRNA FGF-10 bola vykonaná northernová analýza s 2 µg poly A⁺ mRNA z rôznych dospelých ľudských tkanív použitím rádioaktívne značenej celej cDNA FGF-10 ako sondy. Výsledky ukazujú, že 1,4 kb informácie je exprimovaná najhojnejšie v kostrovom svale, na strednej úrovni v srdci, mozgu, placente, ľadvine a pankrease a na nižšej úrovni v pečeni. V srdci sú prítomné 3 ďalšie fragmenty o veľkosti 4,4 kb, 2,4 kb a 0,5 kb. Je pravdepodobné, že tieto rôzne veľkosti mRNA v srdci sú výsledkom alternatívneho zostrihu. V mozgu je tiež prítomná 4,4 kb mRNA. Nylonový blot s 2 µg poly A⁺ mRNA z niekoľkých dospelých ľudských tkanív, naviazaný na membránu, bol získaný od Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA. Tento blot bol hybridizovaný s celou cDNA FGF-10, značenou náhodne iniciovaným značením rádioaktívnym dCTP. Hybridizácia bola uskutočňovaná cez noc pri 65 °C v 7 % SDS, 0,5 M NaPO₄, pH 7,2 a 1 % BSA. Po 2x 30 min premytí v 0,2 x SSC, 0,1 % SDS pri 65 °C bol blot cez noc vystavený röntgenovému filmu s intenzifikačnou clonou.

Príklad 2

Expresia FGF-10 transkripciou a transláciou *in vitro*

cDNA FGF-10, ATCC # 75696, bola podrobená transkripcii a translácii *in vitro* za účelom stanovenia veľkosti prepísateľného polypeptidu kódovaného úplnou a čiastočnou cDNA FGF-10. Úplné a čiastočné inzerty cDNA FGF-10 vo vektore pBluescript SK boli amplifikované pomocou PCR s tromi dvojicami primérov: 1) spätný a priamy primér M13, 2) spätný primér M13 a FGF primér P20, 3) spätný primér M13 a FGF primér P22. Sekvencie týchto primérov sú nasledujúce:

Spätný primér M13-2:

5'-ATGCTTCCGGCTCGTATG-3' (SEQ ID NO 3)

Táto sekvencia je umiestnená pred 5'-koncom inzertu cDNA FGF-10 vo vektore pBluescript a má orientáciu proti smeru cDNA. Medzi týmto primérom a cDNA FGF-10 je umiestená sekvencia promótoru T3.

Priamy primér M13-2:

5'-GGGTTTTCCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID NO 4)

Táto sekvencia je umiestnená za 3'-koncom inzertu cDNA FGF-10 vo vektore pBluescript a má orientáciu proti smeru inzertu cDNA.

FGF primér P20:

5'-GTGAGATCTGAGGGAAGAAGGGGA-3' (SEQ ID NO 5)

Sekvencia 15 bp tohto priméru na 3'-konci je proti smeru sekvencie cDNA FGF-10 bp 780 až 766, ktorá je umiestená 12 bp za stop kodómom.

FGF primér P22:

5'-CCACCGATAATCCTCCTT-3' (SEQ ID NO 6)

Táto sekvencia je umiestená v cDNA FGF-10 v protismernej orientácii a je asi 213 bp za stop kodómom.

Reakcie PCR sa všetkými tromi dvojicami primérov produkujú amplifikované produkty so sekvenciou promótoru T3 pred inzertom cDNA. Všetky tri dvojice primérov produkujú produkty PCR, ktoré kódujú plnú dĺžku polypeptidu FGF-10.

Na transkripciu/transláciu *in vitro* bolo použité približne 1 µg produktu PCR z prvej dvojice primérov, 0,3 µg z druhej dvojice primérov a 0,3 µg z tretej dvojice primérov. Transkripčná/translačná reakcia *in vitro* bola uskutočňovaná v objeme 25 µl použitím systémov spojeného retikulocytového lyzátu T_NTTM (Promega, č. kat. L4950). Konkrétne reakčná zmes obsahuje 12,5 µl lyzátu králičích retikulocytov T_NT, 2 µl reakčného pufru T_NT, 1 µl polymerázy T3, 1 µl 1 mM zmesi aminokyselín (mínus metionín), 4 µl ³⁵S-metionínu (> 1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 1 µl 40 U/µl inhibítora ribonukleázy RNasin a 0,5 alebo 1 µg produktov PCR. Objem bol doplnený H₂O bez obsahu nukleázy na 25 µl. Reakčná zmes bola inkubovaná 2 h pri 30 °C. 5 µl reakčného produktu bolo analyzované na gradiente 4 - 20 % gélu SDS-PAGE. Po fixácii v 25% isopropanole a 10% kyseline octovej bol gél vysušený a vystavený cez noc pri 70 °C röntgenovému filmu.

Ako je znázornené na obr. 3, produkty PCR obsahujúce plnú dĺžku cDNA FGF-10 a cDNA s chýbajúcimi približne 340 bp a približne 140 bp v 3'-neprepísanej oblasti (3'-UTR) produkovali tú istú dĺžku prepísaných produktov, ktorých molekulová hmotnosť sa odhaduje na asi 19 kD (pruhy 2 až 4).

Na základe vyššie uvedených údajov je možné vynález rôzne modifikovať a obmieňať, a preto ho je možné v rozsahu pripojených nárokov uskutočňovať inak než bolo konkrétne opísané.

ZOZNAM SEKVENCÍÍ

(I) VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

(i) PRIHLASOVATEĽ: HU A D.

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: FIBROBLASTOVÝ RASTOVÝ FAKTOR-10

(iii) POČET SEKVENCÍÍ: 6

(iv) KOREŠPONDENČNÁ ADRESA:

(A) ADRESÁT: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI,
STEWART & OLSTEIN

(B) ULICA: 6 BECKER FARM ROAD

(C) MESTO: ROSELAND

(D) ŠTÁT: NEW JERSEY

(E) ZEM: USA

(F) POŠT. KÓD: 07068

(v) STROJOVO ČITATEĽNÁ FORMA:

(A) TYP MÉDIA: DISKETA 3,5 "

(B) POČÍTAČ: IBM PS/2

(C) OPERAČNÝ SYSTÉM: MS-DOS

(D) SOFTWARE: WORD PERFECT 5.1

(vi) ÚDAJE O SÚČASNEJ PRIHLÁŠKE:

(A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY:

(B) DÁTUM PODANIA: SÚČASNE

(C) KLASIFIKÁCIA:

(vii) ÚDAJE O SKORŠEJ PRIHLÁŠKE:

(A) ČÍSLO PRIHLÁŠKY: 08/207,412

(B) DÁTUM PODANIA: 8. MAREC 1994

(viii) INFORMÁCIE O ZÁSTUPCOVI/AGENTOVI:

(A) MENO: FERRARO, GREGORY D.

(B) REGISTRAČNÉ ČÍSLO: 36,134

(C) ZNAČKA/ČÍSLO SPISU: 325800-347

(ix) TELEKOMUNIKAČNÉ INFORMÁCIE:

(A) TELEFÓN: 201-994-1700

(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMÁCIE PRE SEQ ID NO 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 1121 PÁROV BÁZ

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 1:

GGCAAAGTGG	GATGATCTGT	CACTACACCT	GCAGCACCAC	GCTCGGAGGA	CAGCTCCTGC	60
CTGCAGCTTC	CAGACCCAGG	ARGCCTGAGG	GGAGGAAGG	AAGTACGGGC	GAAATCATCA	120
GATTGGCTTC	CCAGATTTGG	GAATCTGAAG	CGGGCCACA	TCTTCCGGCC	AACTTCCATT	180
GAACTTCCCA	GCACTCGAAA	GGGACCGAAA	TGGAGAGCAA	AGAACCCAG	CTCAAAGGGA	240
TTGTGACAAG	GTTATTGAGC	CAGCAGGGAT	ACTTCCTGCA	GATGCACCCA	GATGGTACCA	300
TTGATGGGAC	CAAGGACGAA	AACAGCGACT	ACACTCTCTT	CAATCTAATT	CCCGTGGGCC	360
TGCGTGTAGT	GGCCATCCAA	GGAGTGAAGG	CTAGCCTCTA	TGTGGCCATG	AATGGTGAAG	420
GCTATCTCTA	CAGTTCAGAT	GTTTTCACTC	CAGAATGCAA	ATTCAGGAA	TCTGTGTTTG	480
AAAATACTA	TGTGATCTAT	TCTTCCACAC	TGTACCGCCA	GCAAGAATCA	GGCCGAGCTT	540
GGTTTCTGGG	ACTCAATAAA	GAAGGTCAAA	TTATGAAGGG	GAACAGAGTG	AAGAAAACCA	600
AGCCCTCATC	ACATTTTGTA	CCGAAACCTA	TTGAAGTGTG	TATGTACAGA	GAACCATCGC	660
TACATGAAAT	TGGAGAAAAA	CAAGGGCGTT	CAAGGAAAAG	TTCTGGAACA	CCAACCATGA	720
ATGGAGGCAA	AGTTGTGAAT	CAAGATTCAA	CATAGCTGAG	AACTCTCCCC	TTCTTCCCTC	780
TCTCATCCCT	TCCCCTTCCC	TTCCTTCCCA	TTTACCCATT	TCCTTCCAGT	AAATCCACCC	840
AAGGAGAGGA	AAATAAAATG	ACAACGCAAG	CACCTAGTGG	CTAAGATTCT	GCACTCAAAA	900
TCTTCCTTTG	TGTAGGACAA	GAAAATTGAA	CAAAGCTTG	CITGTTGCAA	TGTTGTAGAA	960
AATTCACGTT	CACAAAGATT	ATCACACTTA	AAAGCAAAGG	AAAAAATAAA	TCAGAACTCC	1020
ATAAATATTA	AACTAAACTG	TATTGTTATT	AGTAGAAGGC	TAATTGTAAT	GAAGACATTA	1080
ATAAAGGTGA	AATAAACTTA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	A		1121

(2) INFORMÁCIE PRE SEQ ID NO 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 181 AMINOKYSELÍN

(B) TYP: AMINOKYSELINA

(C) VLÁKNO:

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: PROTEÍN

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 2:

Met	Glu	Ser	Lys	Glu	Pro	Gln	Leu	Lys	Gly	Ile	Val	Thr	Arg	Leu
				5					10					15
Phe	Ser	Gln	Gln	Gly	Tyr	Phe	Leu	Gln	Met	His	Pro	Asp	Gly	Thr
				20					25					30
Ile	Asp	Gly	Thr	Lys	Asp	Glu	Asn	Ser	Asp	Tyr	Thr	Leu	Phe	Asn
				35					40					45
Leu	Ile	Pro	Val	Gly	Leu	Arg	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Gly	Val	Lys
				50					55					60
Ala	Ser	Leu	Tyr	Val	Ala	Met	Asn	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ser
				65					70					75
Ser	Asp	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Cys	Lys	Phe	Lys	Glu	Ser	Val	Phe
				80					85					90
Glu	Asn	Tyr	Tyr	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gln
				95					100					105
Glu	Ser	Gly	Arg	Ala	Trp	Phe	Leu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Gly	Gln
				110					115					120
Ile	Met	Lys	Gly	Asn	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Ser	Ser	His
				125					130					135
Phe	Val	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Val	Cys	Met	Tyr	Arg	Glu	Pro	Ser
				140					145					150
Leu	His	Glu	Ile	Gly	Glu	Lys	Gln	Gly	Arg	Ser	Arg	Lys	Ser	Ser
				155					160					165

(2) INFORMÁCIA PRE SEQ ID NO 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 18 PÁROV BÁZ

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 3:

ATGCTTCCGG CTCGTATG

18

(2) INFORMÁCIA PRE SEQ ID NO 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 19 PÁROV BÁZ

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 4:

GGGTTTTCCC AGTCACGAC

19

(2) INFORMÁCIA PRE SEQ ID NO 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 24 PÁROV BÁZ

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 5:

GTGAGATCTG AGGGAAGAAG GGGA

24

(2) INFORMÁCIA PRE SEQ ID NO 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 18 PÁROV BÁZ

(B) TYP: NUKLEOVÁ KYSELINA

(C) VLÁKNO: JEDNODUCHÉ

(D) TOPOLOGIA: LINEÁRNA

(ii) TYP MOLEKULY: Oligonukleotid

(xi) POPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO 6:

CCACCGATAA TCCTCCTT

18

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaný polynukleotid, vybraný zo skupiny tvorenej
 - a) polynukleotidom kódujúcim polypeptid s odvodenou sekvenciou aminokyselín SEQ ID NO 2 alebo fragment, analóg alebo derivát tohto polypeptidu,
 - b) polynukleotidom kódujúcim polypeptid so sekvenciou aminokyselín kódovanou cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696, alebo fragment, analóg alebo derivát tohto polypeptidu.
2. Polynukleotid podľa nároku 1, ktorým je DNA.
3. Polynukleotid podľa nároku 1, ktorým je RNA.
4. Polynukleotid podľa nároku 1, ktorým je genómová DNA.
5. Polynukleotid podľa nároku 2, ktorý kóduje polypeptid s odvodenou sekvenciou aminokyselín SEQ ID NO 2.
6. Polynukleotid podľa nároku 2, ktorý kóduje polypeptid kódovaný cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696.

7. Polynukleotid podľa nároku 1, majúci kódujúcu sekvenciu uvedenú ako SEQ ID NO 1.
8. Polynukleotid podľa nároku 2, majúci kódujúcu sekvenciu polypeptidu, uloženú v ATCC pod č. 75696.
9. Vektor obsahujúci DNA podľa nároku 2.
10. Hostiteľská bunka, geneticky manipulovaná vektorom podľa nároku 9.
11. Spôsob výroby polypeptidu, **vyznačujúci sa tým**, že z hostiteľskej bunky podľa nároku 10 exprimuje polypeptid kódovaný uvedenou DNA.
12. Spôsob výroby buniek schopných exprimovať polypeptid, **vyznačujúci sa tým**, že sa bunky geneticky manipulujú vektorom podľa nároku 9.
13. Izolovaná DNA, hybridizovateľná s DNA podľa nároku 2 a kódujúca polypeptid majúci aktivitu FGF-10.
14. Polypeptid zvolený zo skupiny tvorenej (i) polypeptidom s odvodenou sekvenciou aminokyselín SEQ ID NO 2 a jeho fragmenty, analógy alebo deriváty a (ii) polypeptidom kódovaným cDNA, uloženou v ATCC pod č. 75696, a fragmenty, analógy alebo deriváty tohto polypeptidu.

15. Polypeptid podľa nároku 14, ktorým je FGF-10 s odvodenou sekvenciou aminokyselín SEQ ID NO 2.
16. Protilátka proti polypeptidu podľa nároku 14.
17. Zlúčenina účinná ako agonista k polypeptidu podľa nároku 14.
18. Zlúčenina účinná ako antagonistu proti polypeptidu podľa nároku 14.
19. Spôsob ošetrovania pacienta potrebujúceho FGF-10, **vyznačujúci sa tým**, že sa pacientovi podáva terapeuticky účinné množstvo polypeptidu podľa nároku 14.
20. Spôsob ošetrovania pacienta s potrebou inhibície FGF-10, **vyznačujúci sa tým**, že sa pacientovi podáva terapeuticky účinné množstvo zlúčeniny podľa nároku 18.
21. Spôsob podľa nároku 19, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinné množstvo polypeptidu sa podáva poskytovaním DNA kódujúcej uvedený polypeptid pacientovi a expresiou uvedeného polypeptidu *in vivo*.
22. Spôsob identifikácie zlúčenín účinných ako agonisti a antagonistu FGF-10, **vyznačujúci sa tým**, že

- (a) sa za podmienok, keď sú bunky normálne stimulované FGF-10, uvedie do styku FGF-10, zlúčenina podrobovaná screeningu a reakčná zmes obsahujúca bunky, pričom uvedená reakčná zmes obsahuje značku zabudovávanú do buniek pri ich proliferácii, a
- (b) sa stanoví rozsah proliferácie buniek za účelom identifikácie, či je zlúčenina účinným agonistom alebo antagonistom.

23. Spôsob diagnostiky ochorení alebo náchylnosti k ochoreniu súvisiaceho so zníženou expresiou polypeptidu podľa nároku 14, **vyznačujúci sa tým**, že sa stanoví mutácia v sekvencii nukleovej kyseliny kódujúcej tento polypeptid.

24. Spôsob diagnostiky, **vyznačujúci sa tým**, že sa vzorka získaná od hostiteľa analyzuje na prítomnosť polypeptidu podľa nároku 14.

Obr. 1 B

nadvazuje na obr. 1 A

421 GCTATCTACAGTTCAGATGTTTCACTCCAGAATGCAAAATCAAGGAATCTGTGTTTG 480
 Y L Y S S D V F T P E C K F K E S V F E 91

481 AAAACTACTATGTGATCTATTCTTCCACACTGTACCCAGCAAGAATCAGGCCGAGCTT 540
 N Y Y V I Y S S T L Y R Q Q E S G R A W 111

541 GGTTCTGGACTCAATAAAGAAGGTCAAATATGAAGGGGAACAGAGTGAAGAAAACCA 600
 F L G L N K E G Q I M K G N R V K K T K 131

601 AGCCCTCATCATTTGTACCCGAAACCTATGAAAGTGTGTATGTACAGAGAACCATCGC 660
 P S S H F V P K P I E V C M Y R E P S L 151

661 TACATGAAATGGAGAAAACAAGGCGTTCAAGGAAAAGTCTGGAACACCAACCATGA 720
 H E I G E K Q G R S R K S S G T P T M N 171

721 ATGGAGGCAAAGTTGTGAATCAAGATTCAACATAGCTGAGAACTCCTCCCTTCCCTC 780
 G G K V V N Q D S T * 181

nadvazuje na obr. 1 C

Obr. 1 C

nadvázuje na obr. 1 B

781 TCTCATCCCTTCCCCTTCCCCTTCCCATTACCCTTCCAGTAAATCCACCC 840
 841 AAGGAGAGGAAAATAAAATGACAACGCAAGCACCTAGTGGCTAAGATTCTGCACCTCAAAA 900
 901 TCTTCCCTTGTGTAGGACAAGAAAATTGAAACCAAGCTTGTGTCATGTGTAGAA 960
 961 AATTCACGTTCAACAAGATTATCACACTTAAAGCAAGGAAAATAAATCAGAACTCC 1020
 1021 ATAAATATTAACCTAAACTGTATTGTATTAGTAGAAGGCTAATTGTAATGAAGACATTA 1080
 1081 ATAAAGGTGAAATAAACTTAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAA 1121

Obr. 2 B

nadvázuje na obr. 2 A

Fgf-9	GILRRRQLYC	RT..GFHLEI	FPNGTIQGTR	KDHSRFGILE	FISIAVGLVS
Fgf10	GIVTR..LFS	QQ..GYFLQM	HPDGTIDGTK	DENSDYTLFN	LIPVGLRVVA
Fgf-3	GAPRRRKLVC	AT..KYHLQL	HPSGRVNGSL	.ENSAYSILE	ITAVEVGIVA
Fgf-7	GDIRVRRLEFC	RT..QWYLRI	DKRGKVKGTQ	EMKNNYNIME	IRTVAVGIVA

151

200

Fgf-1	IKSTETGQYL	AMTDGLLYG	SQTPNEECLF	LERLEENHYN	TYISKKH...
Fgf-2	IKGVCANRYL	AMKEDGRLLA	SKCVTDECFE	FERLESNNYN	TYRSRKY...
Fgf-4	IFGVASRFV	AMSSKGKLYG	SPFFTDECTE	KEILLPNNYN	AYESYKY...
Fgf-6	IFGVRSALEFV	AMNSKGRLYA	TPSFQEECKE	RETLLPNNYN	AYESDLY...
Fgf-5	IRGVFSNKFL	AMSKKGLHA	SAKFTDDCKE	RERFQENSYN	TYASAIH...
Fgf-9	IRGVDGLLYL	GMNEKGELYG	SEKLTQECVF	REQFEENWYN	TYSSNLY...
Fgf10	IQGVKASLYV	AMNGEGYLYS	SDVFTPECKE	KESVFENYV	IYSSSTLY...
Fgf-3	IRGLESGRYL	AMNKRGRLYA	SEHYSAECEF	VERIHELGIN	TYASRLYRTV
Fgf-7	IKGVESEFFYL	AMNKEGKLYA	KKECNEDCNF	KELILENHYN	TYASAKW...

201

250

Fgf-1AEKNWFVGL	KKNGSCKRG.	.PRTHYGOKA	ILFLPLPVSS
Fgf-2T..SWYVAL	KRTGQYKLG.	.SKTGPQKA	ILFLPMSAKS
Fgf-4PGMFIAL	SKNGKTKKG.	.NRVSPTMKV	THELPRL...
Fgf-6QGTYIAL	SKYGRVKKRG.	.SKVSPIMTV	THELPRI...
Fgf-5RTE	KTGREWYVAL	NKRGKAKRGC	SPRVKQHIS	THELPRFKQS
Fgf-9KHV	DTGRRYYVAL	NKDGTPREG.	.TRTKRHQKF	THELPRPVD.
Fgf10RQQ	ESGRAWFLGL	NKEGQIMKG.	.NRVKTKPS	SHEVFKPIE.
Fgf-3	SSTPGARRQP	SAERLWYVSV	NGKGRPRRG.	.FKTRRTQKS	SLELPRVLDH
Fgf-7T	HNGGEMFVAL	NQKGI PVRG.	.KKTKEQKT	AHFLPMAIT.

nadvázuje na obr. 2 C

Obr. 2 C

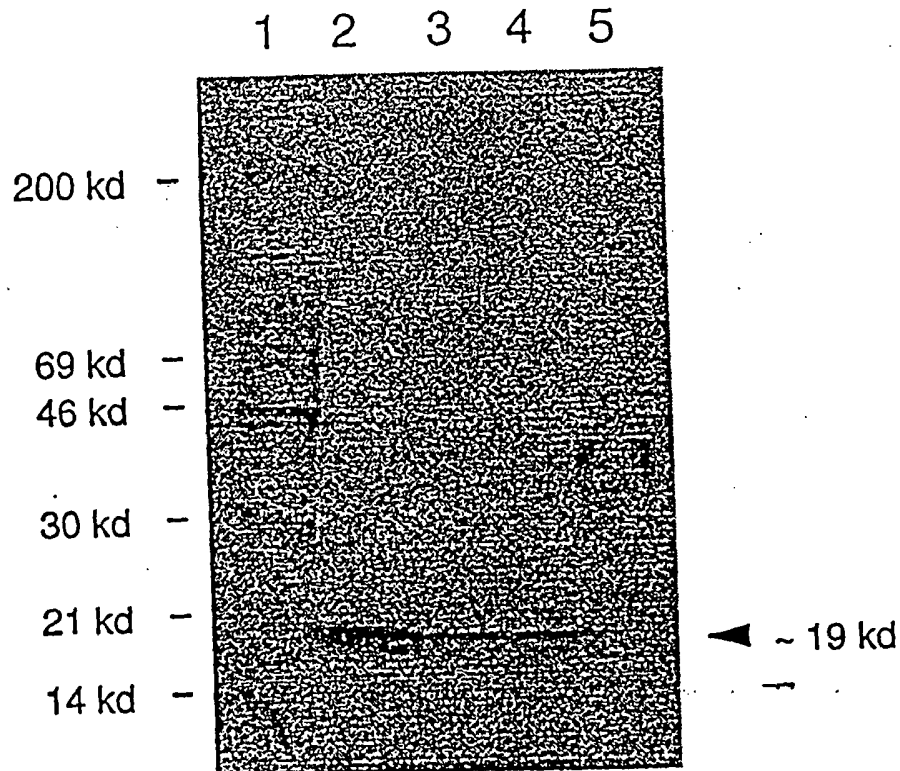
nadvazuje na obr. 2 B

	251	300
Fgf-1	D.....
Fgf-2
Fgf-4
Fgf-6
Fgf-5	EQPELSFTVT VPEKKNPPSP IKSKIPLSAP RKNNTNSVKYR LKFRFG.....	
Fgf-9
Fgf10
Fgf-3	RDHEMVRQLQ SGLPRPPGKG VQPRRRRQKQ SPDNLEPSHV QASRLGSQLE	
Fgf-7

	301
Fgf-1
Fgf-2
Fgf-4
Fgf-6
Fgf-5
Fgf-9
Fgf10	T*..
Fgf-3	ASAH
Fgf-7

7 / 7

Obr. 3



Pruh 1: ^{14}C + marker rainbow M.W.

Pruh 2: FGF-10 (spätňý + priamy primer M13)

Pruh 3: FGF-10 (spätňý primer M13 + primer FGF-P20)

Pruh 4: FGF-10 (spätňý primer M13 + primer FGF-P22)

Pruh 5: kontrola FGF