

Изобретение относится к изоляции, очистке и рекомбинации или химическому синтезу белков, влияющих на жизнеспособность, размножение, видоизменение и зрелость кроветворных клеток, особенно тромбоцитообразующих клеток. Данное изобретение главным образом относится к клонированию и экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих лиганды белков, способные связываться с *tnfr*, членом сверхсемейства цитокиновых рецепторов, и активировать его. Изобретение также относится к использованию этих белков, индивидуально или в сочетании с другими цитокинами для лечения иммунных заболеваний или нарушений кроветворения, включая тромбоцитопению.

#### 1. Кроветворная система

Кроветворная система вырабатывает зрелые, имеющие высокоспециализированное назначение клетки крови, известные науке как жизненно необходимые для всех млекопитающих. Эти зрелые клетки включают: эритроциты, переносящие кислород и углекислый газ, Т- и В-лимфоциты, отвечающие за иммунитет на основе клеток или антител, тромбоциты, отвечающие за свертывание крови, и гранулоциты и макрофаги, специализирующиеся на удалении вредных веществ и шлаков и выступающие вспомогательными клетками при борьбе с инфекцией. Гранулоциты, в свою очередь, подразделяются на нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки, "специализированные типы клеток, имеющие различные функции. Примечательно, что все эти специализированные типы зрелых клеток происходят от одного общего простейшего типа клеток, известных как плюрипотенциальные стволовые клетки, первоначально найденные в костном мозге [Dexter et al., *Ann. Rev. Cell Biol.*, 3:423-441 (1987)].

Зрелые высокоспециализированные клетки крови должны постоянно вырабатываться в больших количествах в течение всей жизни млекопитающего. Подавляющее большинство этих специализированных клеток крови остаются функционально активными лишь от нескольких часов до нескольких недель [Cronkite et al., *Blood Cells*, 2:263-284 (1976)]. Таким образом, необходимо постоянное возобновление зрелых клеток крови, самого клеточного ствола, а также всех промежуточных или связующих первичных клеточных линий, лежащих между простейшими и зрелыми клетками, чтобы поддерживать нормальное стабильное состояние клеток крови млекопитающих.

Сердцем кроветворной системы является плюрипотенциальная стволовая клетка (клетки). Эти клетки сравнительно немногочисленны и подвергаются самовозобновлению путем размножения, вырабатывая дочерний ствол, или трансформируются путем нескольких этапов видоизменений, в более зрелые прародительские клетки с ограниченными линиями воспроизводства, в конечном счете образующие высокоспециализированные зрелые кровяные клетки.

Например, определенные мультипотенциальные прародительские клетки, известные в литературе как CFC-Mix и происходящие от клеток ствола, подвергаются размножению (самовозобновлению) и развитию, вырабатывая колонии, содержащие различные миелоидные клетки: эритроциты, нейтрофилы, мегакарициты (предшественники тромбоцитов), макрофаги, базофилы, эозинофилы и тучные клетки. Другие прародительские клетки лимфоидного происхождения подвергаются размножению и развитию в Т-клетки и В-клетки.

Кроме того, между прародительскими клетками CFC-Mix и миелоидными клетками лежит другой, промежуточный, класс прародительских клеток. Эти прародительские клетки с ограниченными линиями воспроизводства классифицируются на основе потомства, которое они вырабатывают. Так, известными непосредственными предшественниками миелоидных клеток являются эритроидные колониеобразующие элементы (CFU-E) для эритроцитов, гранулоцито/макрофаго-колониеобразующие клетки (GM-CFC) для нейтрофилов и макрофагов, мегакариоцитоколониеобразующие клетки (Meg-CFC) для мегакарицитов, эозинофил-колониеобразующие клетки (Eos-CFC) для эозинофилов и базофил-колониеобразующие клетки (Bas-CFC) для тучных клеток. Известны (см. ниже) или могут быть открыты также другие промежуточные прародительские клетки между плюрипотенциальными стволовыми клетками и законченными кровяными клетками, отличающиеся различной степенью ограниченности воспроизводства и возможностями самовозобновления.

По всей видимости, основа нормальной системы кроветворения - снижение способности к самовозобновлению в мультипотенциальном качестве и приобретение качества ограниченности воспроизводства и законченности в развитии. Так, у одной границы спектра кроветворных клеток лежит плюрипотенциальная стволовая клетка, обладающая способностью к самовозобновлению и видоизменению во все различные видо-специфические прародительские клетки. Эта способность является основой метода трансплантации костного мозга, при котором простейшие стволовые клетки воссоздают целую систему кроветворных клеток. У другой границы спектра лежат прародительские клетки с высокой ограниченностью воспроизводства и их потомство, которое потеряло способность к самовозобновлению, но приобрело зрелую функциональную активность.

Размножение и развитие стволовых клеток и прародительских клеток с ограниченными линиями воспроизводства строго контролируется различными агентами роста кроветворных клеток или цитокинами. Роль этих агентов роста в живых организмах сложна и не до конца понятна. Некоторые агенты роста, такие как интерлейкин-3 (IL-3), способны стимулировать как мультипотенциальные стволовые клетки, так и прародительские клетки нескольких ветвей потомства, включая, например, мегакарициты. Другие агенты, такие как гранулоцито/макрофаго-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), первоначально был определен как действующий только на клетки GM-CFC. Позднее, однако, было обнаружено, что он также влияет на размножение и развитие также и мегакарицитов. Так, оказалось, что IL-3 и GM-CSF имеют перекрывающиеся области биологической активности, хотя с различной мощностью. Еще позднее было открыто, что интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-11 (IL-11), не оказывая очевидного влияния на образование мег-колоний по отдельности, показывают синергический эффект с IL-3, стимулируя развитие мегакарицитов [Yonemura et al., *Exp. Hematol.*, 20:1011-1016 (1992)].

Итак, агенты роста кроветворных клеток могут влиять на рост и видоизменение одной или более линий, их активность может перекрываться с другими агентами роста во влиянии на одну клеточную линию, или может проявляться синергически с другими агентами.

Оказывается также, что агенты роста могут проявлять свой эффект на различных стадиях развития клеток от плюрипотенциальных стволовых клеток, через различные передаточные прародительские клетки с ограниченными линиями воспроизводства до зрелых кровяных клеток. Например, эритропоэтин (еро) показывает ускорение размножения только зрелых эритроидных прародительских клеток. IL-3 проявляет свой эффект раньше, действуя на простейшие стволовые клетки и промежуточные прародительские клетки с ограниченными линиями воспроизводства. Другие агенты роста, такие как агент стволовых клеток (SCF) могут влиять даже на еще более примитивные клетки.

Из вышеизложенного следует вывод, что вновь открытые агенты роста, которые влияют на жизнеспособность, размножение, видоизменение или зрелость любых кровяных клеток или их предшественников, могут быть полезны, особенно при восстановлении кроветворной системы, активность которой снижена из-за болезни или после радио- или химиотерапии.

## II. Мегакариопоэз и выработка тромбоцитов

Закономерности мегакариопоэза и выработки тромбоцитов описан у [Mazur, Exp. Hematol., 15:248 (1987) и Hoffman, Blood, 74:1196-1212 (1989)]. Коротко: плюрипотенциальные стволовые клетки костного мозга видоизменяются в мегакариоциты, эритроциты и клетки миелоцитарных линий. Считается, что существует иерархия передаточных мегакариоцитарных прародительских клеток между стволовыми клетками и мегакариоцитами. Было идентифицировано как минимум три класса мегакариоцитарных прародительских клеток, а именно: мегакариоциты всплескообразующего элемента (BFU-MK), мегакариоциты колониеобразующего элемента (CFU-MK) и прародительские клетки мегакариоцитов низкой плотности (LD-CFU-MK). Процесс развития мегакариоцитов представляет собой последовательность из трех стадий, базирующуюся на стандартном морфологическом критерии. Первые распознаваемые члены семейства мегакариоцитов (МК или meg) - мегакариобласты. Эти клетки первоначально составляют 20-30 мкм в диаметре и имеют базофильную цитоплазму и ядро невыразительной формы с сетчатым хроматином и несколькими ядрышками. Затем мегакариобласты могут содержать до 32 ядер (полиплоид), но цитоплазма остается разреженной и незрелой. По мере развития, ядро становится более выпуклым и окрашенным, количество цитоплазмы увеличивается и она становится более ацидофильной и зернистой. Более зрелые клетки этого семейства могут на периферии создавать видимость появления тромбоцитов. Обычно на стадии бластов находится менее 10% мегакариоцитов, а более 50% являются зрелыми. Произвольно выбранная морфологическая классификация, обычно применяемая к семейству мегакариоцитов, следующая: в самой ранней форме - мегакариобласты; в промежуточной форме - промегакариоциты или базофильные мегакариоциты, и в последних формах - зрелые (ацидофильные, зернистые или тромбоцит-образующие) мегакариоциты. Зрелые мегакариоциты вытягивают нити цитоплазмы в синусоидальном направлении, эти нити отсоединяются и разделяются на отдельные тромбоциты [Williams et al., Hematology, 1972].

Считается, что мегакариопоэз включает несколько регулирующих факторов [Williams et al., Br. J. Hematol., 52:173 (1982)] и [Williams et al., D. Cell Physiol., 110:101 (1982)]. Ранняя стадия мегакариопоэза определена как митотическая, касающаяся, размножения клеток и инициирования колоний из CFU-MK, но на которую не влияет количество тромбоцитов [Burststein et al., J. Cell Physiol., 109:333 (1981) и Kimura et al., Exp. Hematol., 13:1048 (1985)]. Последняя стадия развития - не митотическая - включает ядерную полиплоидизацию и цитоплазматическое развитие и, вероятно, регулируется механизмом обратной связи по периферийному числу тромбоцитов [Odell et al., Blood, 48:765 (1976) и Ebbe et al., Blood, 32:787 (1968)].

Обсуждалось существование отчетливых, имеющих специфическое строение, колониестимулирующих агентов для мегакариоцитов [Mazur, Exp. Hematol., 15:340-350 (1987)]. Однако большинство авторов считают, что столь важный для жизни процесс, как выработка тромбоцитов, должен регулироваться цитокином (цитокинами), ответственными за этот процесс. Гипотеза существования специфического цитокина (цитокинов) дала толчок для более чем 30-летнего поиска, но до сих пор такой цитокин не был выделен и классифицирован как единственный МК-CSF (ТРО).

Хотя было описано, что МК-CSF были частично выделены из экспериментально выработанной тромбоцитопении [Hill et al., Exp. Hematol., 14:752 (1986)], из кондиционированной среды почки человеческого эмбриона [CM] [McDonald et al., J. Lab. Clin. Med., 85:59 (1975)], в человеке из пластической анемии и мочевых экстрактов идиопатической тромбоцитопенической пурпуры [Kawakita et al., Blood, 6:556 (1983)] и плазмы [Hoffman et al., J. Clin. Invest., 75:1174 (1985)], их физиологические функции в большинстве случаев еще непонятны.

Кондиционированная среда митоген-активированных селезеночных клеток фитолакки американской (PWM-SpCM) и клеточная линия мышинных миеломоноцитов WEHI-3 (WEHI-3CM) использовались в качестве среды для образования мегакариоцитов. PWM-SpCM содержит агенты, вызывающие рост CFU-MK [Metcalf et al., Pro. Natl. Acad. Sci., USA, 72:1744-1748 (1975); Quesenberry et al., Blood, 65:214 (1985); Iscove, N.N., in Hematopoietic Cell Differentiation, ICRN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol.10, Golde et al., eds. (New York, Academy Press) pp.37-52 (1978)], одним из которых является интерлейкин-3 (IL-3), мультитвидовой колониестимулирующий агент (multi-CSF [Burststein, Blood Cells, 11:469 (1986)]). Другие агенты в этой среде еще не идентифицированы и не выделены. WEHI-3 миелосаркоматная клеточная линия мыши, выделяющая относительно большое количество IL-3 и меньшее количество GM-CSF. Было обнаружено, что IL-3 усиливает рост широкого спектра кроветворных клеток [Ihle et al., D.Immunol., 13:282 (1983)]. Также был обнаружен синергический эффект IL-3 со многими известными кроветворными гормонами или агентами роста [Bartelmez et al., J.Cell Physiol., 122:362-369 (1985) и Warren et al., Cell, 46:667-674 (1988)], включая эритропоэтин (ЕРО) и интерлейкин-1 (IL-1), при введении самых ранних мультитвидовых предшественников и образовании очень больших смешанных колоний кроветворных клеток.

Другие источники усилителей образования мегакариоцитов были найдены в клеточных линиях макрофагов легких и костей мыши, клеток брюшинных выделений и почечных клетках человеческого эмбриона. Несмотря на некоторые противоречивые данные [Mazur, Exp. Hematol., 15:340-350 (1987)], очевидно [Geissler et al., Br. J. Haematol., 60:233-238 (1985)], что в мегакариоцитопозе усиливающую роль больше играют активированные Т-лимфоциты, чем моноциты. Эти заключения наводят на мысль о том, что выделения активированных Т-лимфоцитов, такие как интерлейкины, могут быть регулирующими агентами в развитии МК [Geissler et al., Exp. Hematol., 15:845-853 (1987)]. Большое число работ по мегакариоцитопозу с очищенным эритропоэтином EPO [Vainchenker et al., Blood, 54:940 (1979); McLeod et al., Nature, 261:492-4 (1976); Williams et al., Exp. Hematol., 12:734 (1984)] показывает, что этот гормон оказывает усиливающее влияние на образование колонии МК. Это было также продемонстрировано на сывороточных и бессывороточных культурах и в отсутствие вспомогательных клеток [Williams et al., Exp. Hematol., 12:734 (1984)]. EPO было дано определение как участвующему скорее в одно- и двухклеточной стадии мегакариоцитопоза, в отличие от PWM-SpCM, участвующего в четырехклеточной стадии развития мегакариоцита. Взаимодействие всех этих агентов, как на ранних, так и на поздних стадиях мегакариоцитопоза еще предстоит изучить.

Данные, полученные в нескольких лабораториях, наводят на мысль о том, что единственными мультивидовыми агентами, которые по отдельности обладают МК-колониестимулирующей активностью, являются GM-CSF и IL-3 и в меньшей степени стимулирующий В-клетки агент IL-6 [Ikebuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:9035 (1987)]. Позднее несколько авторов сообщили о том, что IL-11 и агент ингибирования лейкемии (LIE) взаимодействуют синергически с IL-3, увеличивая размер и плоидность мегакариоцита [Yonemura et al., British Journal of Hematology, 84:16-23 (1993); Burstein et al., J. Cell. Physiol., 153:305-312 (1992); Metcalf et al., Blood, 76:50-56 (1990); Metcalf et al., Blood, 77:2150-2153 (1991); Bruno et al., Exp. Hematol., 19:378-381 (1991); Yonemura et al., Exp. Hematol., 20:1011-1016 (1992)].

Другие документы, представляющие интерес, включают: [Eppstein et al., U.S. Patent No.4,962,091; Chong, U.S. Patent No.4,879,111; Fernandes et al., U.S. Patent No.4,604,377; Wissler et al., U.S. Patent No.4,512,971; Gottlieb et al., U.S. Patent No.4,468,379; Bennett et al., U.S. Patent No.5,215,895; Kogan et al., U.S. Patent No.5,250,732; Kimura et al., Eur. J. Immunol., 20(9):1927-1931 (1990); Secor et al., J. of Immunol., 144(4):1484-1489 (1990); Warren et al., J. of Immunol., 140(1):94-99 (1988); Warren et al., Exp. Hematol., 17(11):1095-1099 (1989); Bruno et al., Exp. Hematol., 17(10):1038-1043 (1989); Tanikawa et al., Exp. Hematol., 17(8):883-888 (1989); Koike et al., Blood, 75(12):2286-2291 (1990); Lotem, Blood, 75(5):1545-1551 (1989); Rennick et al., Blood, 73(7): 1828-1835 (1989); Clutterbuck et al., Blood, 73(6):1504-1512 (1989)].

### III. Тромбоцитопения

Тромбоциты являются основными элементами механизма свертывания крови. Снижение уровня циркулирующих тромбоцитов, называемое тромбоцитопенией, происходит при различных клинических состояниях и заболеваниях. Диагноз тромбоцитопении в общем случае ставится при количестве тромбоцитов ниже  $150 \times 10^9$  на литр. Главные причины тромбоцитопении могут быть разбиты на три категории, исходя из продолжительности жизни тромбоцитов, а именно: (1) ухудшение вырабатывания тромбоцитов костным мозгом, (2) изоляция тромбоцитов в селезенке (спленомегалия) или (3) повышенная деструкция тромбоцитов в периферийной циркуляции (т.е. аутоиммунная тромбоцитопения или химио- и радиационная терапия). Кроме того, у пациентов, получающих большие количества быстроусвояемых, бедных на тромбоциты препаратов крови, тромбоцитопения может развиваться из-за разбавления крови.

Клинические проявления тромбоцитопении зависят от степени болезни, ее причины и возможных сопутствующих коагуляционных дефектов. В общем случае, пациенты с числом тромбоцитов между  $20$  и  $100 \times 10^9$  на литр подвергаются риску чрезмерной пост-травматической потери крови, в то время, как пациенты с числом тромбоцитов ниже  $20 \times 10^9$  на литр подвергаются риску самопроизвольной потери крови. Эти последние пациенты являются кандидатами на переливание тромбоцитов с сопутствующим риском получения иммунодефицита и вирусов. При любой степени тромбоцитопении потеря крови имеет тенденцию к ужесточению, когда причиной является не увеличение деструкции тромбоцитов, а снижение их образования. В первой ситуации ускоренное разрушение тромбоцитов приводит к циркуляции более молодых, больших по размеру и гемостатически более эффективных тромбоцитов. Тромбоцитопения может появляться от различных заболеваний, коротко описанных ниже. Более детальное описание можно найти у [Schafner, A.I., "Thrombocytopenia and Disorders of Platelet Function", Internal Medicine, 3rd Ed., John D. Hutton et al., Eds., Little Brown and Co., Boston/Toronto/London (1990)].

#### (а) Тромбоцитопения, обусловленная ухудшением образования тромбоцитов

Причины врожденной тромбоцитопении включают органическую апластическую анемию (синдром Фанкони) и врожденную амегакариоцитную тромбоцитопению, которая может быть связана с пороком развития скелета. Развивающееся заболевание вырабатывания тромбоцитов обусловлено либо гипоплазией мегакариоцитов, либо неэффективным тромбоцитопозом. Мегакариоцитная гипоплазия может быть результатом различных состояний, например, аплазии костного мозга (включая идиопатические формы или миелоугнетение при помощи химиоили радиотерапии), миелодисплазии, лейкомии, инвазии костного мозга метастатической опухолью или гранулемами. В некоторых случаях токсины, инфекционные агенты или лекарства могут избирательно влиять на тромбоцитопоз; примеры включают временную тромбоцитопению, вызванную алкоголем и определенными вирусными инфекциями, а также легкую тромбоцитопению, связанную с приемом тиазидных мочегонных средств. Наконец, неэффективный тромбоцитопоз, являющийся следствием мегалобластических процессов (недостаточность фолатов или  $B_{12}$ ), также может вызвать тромбоцитопению, обычно при сопутствующей анемии и лейкопении.

Текущее лечение тромбоцитопении, вызванной ухудшением образования тромбоцитов, зависит от идентификации и устранения причины расстройства костного мозга. Переливание тромбоцитов обычно применяется только для пациентов с серьезными осложнениями потери крови или для восстановления после потерь во время хирургических операций, поскольку изоиммунизация может привести к невосприимчивости к

дальнейшим переливаниям. Потери из слизистых оболочек, вызванные тяжелой формой тромбоцитопении, могут быть восставлены оральным или внутривенным введением антифибринолитических агентов. Тромбоцитная недостаточность может, однако, развиваться, если антифибринолитические агенты используются пациентом с рассеянной интраваскулярной коагуляцией (DIC).

(b) Тромбоцитопения, обусловленная селезеночной изоляцией

Спленомегалии, вызванной любыми причинами, может сопутствовать легкая или средняя тромбоцитопения. Это в основном пассивный процесс (гиперспленизм) селезеночной изоляции тромбоцитов, в отличие от активной деструкции тромбоцитов селезенкой в случаях иммуноопосредованной тромбоцитопении, описанной ниже. Хотя самой распространенной причиной гиперспленизма является застойная спленомегалия из-за портальной гипертензии, обусловленной алкогольным циррозом, другие формы застойной, инфильтратной или лимфопролиферативной спленомегалии также связаны с тромбоцитопенией. Количество тромбоцитов в результате одного гиперспленизма чаще всего не падает ниже  $50 \times 10^9$  на литр.

(c) Тромбоцитопения, обусловленная неиммуно-опосредованной деструкцией тромбоцитов

Тромбоцитопения может быть результатом ускоренной деструкции тромбоцитов вследствие различных неиммунологических процессов. Расстройства этого типа включают рассеянную интраваскулярную коагуляцию, протезные интраваскулярные устройства, экстракорпоральная циркуляция крови, тромбоцитические микроангиопатии, такие как тромбоцитическая тромбоцитная пурпура. Во всех этих случаях циркулирующие тромбоциты, находящиеся близко к искусственным поверхностям или к аномальной васкулярной интиме, или поглощаются в этих местах, или повреждаются и затем удаляются ретикулоэндотелиальной системой. Болезненные состояния или расстройства, при которых рассеянная интраваскулярная коагуляция (DIC) может усиливаться, описаны в Braunwald et al. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11th Ed., p.1478, McGraw Hill (1987). Интраваскулярные протезные устройства, включающие кардиальные клапаны и внутриаортные баллоны, могут вызывать от легкой до средней степени деструктивной тромбоцитопении и временной тромбоцитопении у пациентов с кардиологическим искусственным кровообращением или гемодиализом из-за поглощения или повреждения тромбоцитов в экстракорпоральной системе.

(d) Лекарственная иммунная тромбоцитопения

При иммунологически опосредованной тромбоцитопении было исследовано более 100 лекарственных веществ. Однако хорошо себя зарекомендовали только хинидин, хинин, золото, сульфонамиды, цефалотин и гепарин. Лекарственная тромбоцитопения часто носит тяжелые формы и резко проявляется главным образом в течение тех дней, когда пациент принимает сенсibilизирующие медикаменты.

(e) Иммунная (аутоиммунная) тромбоцитопеническая пурпура (ITP)

ITP у взрослых представляет собой хроническое заболевание, характеризующее аутоиммунной деструкцией тромбоцитов. Аутоантителами обычно являются IgG, хотя другие иммуноглобулины тоже описаны. Хотя были найдены аутоантитела ITP, связанные с мембраной тромбоцитов GPIIb/IIIa, в большинстве случаев специфика антигенов тромбоцитов не идентифицирована. Экстравазальная деструкция сенсibilизированных тромбоцитов происходит в ретикулоэндотелиальной системе селезенки и печени. Хотя более половины случаев ITP являются идиопатическими, многие пациенты страдают ревматическими или аутоиммунными заболеваниями (например, системная красная волчанка) или лимфопролиферативными расстройствами (хроническая лимфоцитарная лейкемия).

(f) ВИЧ-обусловленная тромбоцитопения

ITP является частой причиной ВИЧ-инфекции [Morris et al., *Ann. Intern. Med.*, 96:714-717 (1982)], появляющейся на любой стадии болезни, как у пациентов с диагнозом синдрома приобретенного иммунодефицита (AIDS), с AIDS-связанным комплексом, так и у пациентов с ВИЧ-инфекцией, но без симптомов AIDS. ВИЧ-инфекция представляет собой передающуюся болезнь, характеризующую глубоким дефицитом функции клеточного иммунитета и появлением условно-патогенных инфекций и злокачественных образований. Первичной иммунологической аномалией в результате инфекции ВИЧ является прогрессирующее истощение и функциональное ухудшение Т-лимфоцитов, выделяющих клеточный поверхностный гликопротеин CD4 [Lane et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 3:477 (1985)]. Потеря CD4 Т-клетками, вероятно, вызывает глубокие нарушения клеточного и гуморального иммунитета, ведущие к возникновению условно-патогенных инфекций и злокачественных характеристик AIDS (H. Lane выше).

Хотя механизм ВИЧ-обусловленной ITP не изучен, считается, что он отличен от механизма ITP, не связанной с ВИЧ-инфекцией. [Walsh et al., *N.Eng. J. Med.*, 311:635-639 (1984); Ratner, *Am. J. Med.*, 86:194-198 (1989)].

IV. Текущее лечение тромбоцитопении

Тактика лечения тромбоцитопении диктуется тяжестью заболевания и срочностью клинической ситуации. Способы лечения ВИЧ-обусловленной и не-ВИЧ-обусловленной тромбоцитопении сходны, и хотя было испробовано много различных терапевтических подходов к лечению, терапия остается темой для дискуссий.

Количество тромбоцитов у пациентов с диагнозом тромбоцитопения успешно увеличивается при применении глюкокортикоида (например, преднизолона), однако у большинства пациентов наблюдается неполный результат или возникновение рецидива при снижении дозы глюкокортикоида или прекращении его приема. Основываясь на исследованиях пациентов с ВИЧ-связанной тромбоцитопенией, некоторые ученые предположили, что глюкокортикоидная терапия может привести к предрасположенности к СПИДу. Глюкокортикоиды обычно назначают, когда число тромбоцитов падает ниже  $20 \times 10^9$ /литр или если происходит самопроизвольная потеря крови.

Пациентам, невосприимчивым к глюкокортикоидам, может назначаться соединение формулы

4-(2-хлорфенил)-9-метил-2-[3-(4-морфолинил)-3-пропанон-1-ил]6Нт-иено[3,2,г][1,2,4]триазоло[4,3,а][1,4]дiazепин (WEB 2086)



для успешного лечения тяжелых форм не-ВИЧ-обусловленной ИТР. Пациенты с количеством тромбоцитов 37000-58000/мкл получали WEB 2086 и через 1-2 недели лечения количество тромбоцитов увеличивалось до 140000-190000/мкл. [EP 361,077 и Lohman et al., Lancet, 1147 (1988)].

Хотя оптимальное лечение амегакариоцитарной тромбоцитопенической пурпury (ААТР) еще не определено, применение антиtimoцитоглобулина (АТГ), лошадиной антисыворотки для ткани человеческой вилочковой железы, приводит к длительной полной ремиссии [Trimble et al., Am. J.Hematol., 37:126-127 (1991)]. Однако, последние отчеты показывают, что кроветворное действие АТГ присуще тимеросалу, в котором, предположительно, белок выступает в качестве носителя серы [Panella et al., Cancer Research, 50:4429-4435 (1990)].

Хорошие результаты показывает спленэктомия. При этом удаляется основное место деструкции тромбоцитов и основной источник вырабатывания аутоантител у многих пациентов. Результатом этой процедуры является длительная ремиссия без лечения у большого количества пациентов. Однако, поскольку хирургические операции нежелательны для пациентов с иммунной недостаточностью, спленэктомия рекомендуется только в тяжелых случаях тромбоцитопении (например, при тяжелой форме ВИЧ-обусловленной ИТР), для пациентов с неудовлетворительным результатом 2-3-недельного лечения глюкокортикоидом или рецидивом после прекращения приема глюкокортикоида. Имеющиеся исследовательские данные пока не дают представления о том, почему спленэктомия вызывает предрасположенность пациентов к СПИДу.

Кроме преднизолоновой терапии и спленэктомии используются также некоторые цитотоксические агенты, например, винкристин и азидотимидин (АЗТ, зидовудин), которые показывают улучшение при лечении ВИЧ-обусловленной тромбоцитопении; однако, результаты являются еще предварительными.

Из вышеизложенного следует вывод, что одним способом лечения тромбоцитопении является получение агента, способного ускорять видоизменение и развитие мегакариоцитов или их предшественников в тромбоцито-продуцирующую форму. В определении такого агента, обычно называемого "тромбопоэтин" (ТРО) была проделана значительная работа. Другие названия, часто используемые для ТРО в литературе, включают: агент стимуляции тромбоцитопоэза (TSF), мегакариоцито-колониестимулирующий агент (МК-CSF), мегакариоцитостимулирующий агент и потенцирующее средство для мегакариоцитов. Впервые действие ТРО было исследовано в 1959 году [Rak et al., Med. Exp., 1:125], и попытки выделить и очистить этот агент продолжаются до сегодняшнего дня. Существуют описания частичной очистки ТРО-активных полипептидов [см., например, Tayrien et al., J. Biol. Chem., 262:3262 (1987) and Hoffman et al., J. Clin. Invest. 75:1174 (1985)], другие утверждают, что ТРО не является отдельной сущностью, а скорее представляет собой полифункциональную экспрессию известного гормона [IL-3, Sparrow et al., Prog Clin. Biol. Res., 215:123 (1986)]. Независимо от ее формы и природы, молекула, обладающая тромбопоэтической активностью, имеет огромное терапевтическое значение. Хотя ни один белок еще однозначно не идентифицирован как ТРО, несомненный интерес вызывает недавнее открытие, что *mpl*, предполагаемый цитокиновый рецептор, может служить передатчиком тромбопоэтического сигнала.

#### V. *Mpl* - Мегакариопоэтический цитокиновый рецептор

Считается, что размножение и развитие кроветворных клеток строго регулируется агентами, которые положительно или отрицательно влияют на размножение и мультивидовое изменение плюрипотенциальных стволовых клеток. Это действие оказывается при посредстве связей высокого сродства внеклеточных белковых агентов со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Эти рецепторы клеточной поверхности обладают большой степенью гомологичности и в целом классифицируются как члены сверхсемейства цитокиновых рецепторов. Члены сверхсемейства включают рецепторы для: IL-2 (с и  $\gamma$  цепи) [Hatakeyama et al., Science, 257:379-382 (1991)], IL-3 [Itoh et al., Science, 247:324-328 (1990), Gorman et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 87:5459-5463 (1990); Kitamura et al., Cell, 66:1165-1174 (1991a); Kitamura Proc Natl. Acad. Sci. USA, 88:5082-5086 (1991b)]; IL-4 Mosley et al., Cell, 59:335-348 (1989); IL-5 [Takaki et al., EMBO J., 9:4367-4374 (1990); Tavernier et al., Cell, 66:1175-1184 (1991)]; IL-6 [Yamasaki et al., Science, 241:825-828 (1988); Hibi et al., Cell, 63:1149-1157 (1990)]; IL-7 [Goodwin et al., Cell 60:941-951 (1990)], IL-9 [Renault et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 89:5690-5694 (1992)]; гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий агент (GM-CSF) [Gearing et al., EMBO J., 8:3667-3676 (1991); Hayashida et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 244:9655-9659 (1990)]; гранулоцито-колониестимулирующий агент (G-CSF) [Fukunaga et al., Cell 61:341-350 (1990a) Fukunaga et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 87:8702-8706 (1990b); Larsen et al., D. Exp. Med., 172:1559-1570 (1990), EPO [D'Andrea et al., Cell, 57: 277-285 (1989); Jones et al., Blood, 76:31-35 (1990)], агент ингибирования лейкемии (LIF) [Gearing et al., EMBO J., 10:2839-2848 (1991), онкостатин М (OSM) [Rose et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 88:8641-8645 (1991), а также рецепторы для пролактина [Boutin et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 88:7744-7748 (1988); Ederly et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 86:2112-2116 (1989)], гормон роста (GH) [Leung et al., Nature, 330:537-543 (1987)] и ресничный нейротрофический агент (CNTF) [Davis et al., Science, 253:59-63 (1991)].

Члены сверхсемейства цитокиновых рецепторов можно сгруппировать в три функциональные категории [обзор см. Nicola et al., Cell, 67:1-4 (1991)]. Первый класс включает рецепторы, состоящие из одной цепи, такие как рецептор эритропоэтина (EPO-R) или рецептор гранулоцито-колониестимулирующего агента (G-CSF-R), которые связывают лиганды высокого сродства при посредстве внеклеточных доменов и генерируют внутриклеточный сигнал. Второй класс рецепторов, так называемых р-подэлементов, включает рецептор интерлейкина-6 (IL6-R), рецептор гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующего агента (GM-CSF-R) рецептор интерлейкина-3 (IL3-Rp) и другие члены сверхсемейства, цитокиновых рецепторов. Эти р-подэлементы связывают лиганды низкого сродства, но не генерируют внутриклеточного сигнала. Рецептор с высоким сродством, обладающий способностью сигнализации, генерируется гетеродимером между р-подэлементом и членом третьего класса цитокиновых рецепторов, называемых с-подэлементами, например, сс, общий с-подэлемент для трех р-подэлементов IL3-Rp и GM-CSF-R.

То, что *mpl* является членом сверхсемейства цитокиновых рецепторов, очевидно из гомологии последовательности оснований ДНК [Gearing et al., EMBO J., 8:3667-3676 (1988); Bazan, Proc Natl. Acad. Sci.

USA, 87:6834-6938 (1990)] [Davis et al., Science, 253:59-63 (1991), Vigon et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-5644 (1992)] и его способности переносить пролиферативные сигналы.

Белковая цепь, выведенная при молекулярном клонировании с-*mpl* мыши, оказалась гомологичной другим цитокиновым рецепторам. Внеклеточный домен содержит 465 аминокислотных остатков и состоит из двух поддоменов, каждый с четырьмя высококонсервированными цистеинами и специфической цепью в поддоме с амино-окончанием и в поддоме с карбокси-окончанием. Лиганд-связующие внеклеточные домены предположительно имеют сходную двойную с-ствольную складчатую геометрическую структуру. Этот двойной внеклеточный домен высокоомологичен сигналопередающей цепи, общей для рецепторов IL-3, IL-5 и GM-CSF, а также связующему домену низкого родства LIF (Vigon et al., Oncogene, 8:2607-2615 [1993]). Таким образом, *mpl* могут принадлежать к классу цитокиновых рецепторов, связующих лиганды низкого родства.

Сравнение мышиного *mpl* и зрелого человеческого *mpl* Р обнаружило, что последовательность оснований ДНК этих двух белков на 81% идентична. Более точный анализ показал, что последовательности внеклеточных доменов с N-окончаниями и C-окончаниями идентичны на 75% и 80% соответственно. Наиболее законсервированная область *mpl* представляет собой цитоплазматический домен, показывающий 91% идентичности аминокислот, с последовательностью 37 остатков около трансмембранного домена, идентичных в обоих видах. В соответствии с этим, *mpl* описывается как один из наиболее законсервированных членов сверхсемейства цитокиновых рецепторов (Vigon выше).

То, что *mpl* является функциональным рецептором, способным передавать пролиферативный сигнал, очевидно из строения химерических рецепторов, включающих внеклеточный домен из цитокинового рецептора, имеющего высокое родство к известному цитокину с цитоплазматическим доменом *mpl*. Поскольку до сих пор не описано ни одного известного лиганда для *mpl*, было необходимо построить химерический лиганд высокого родства, связующий внеклеточный домен из таких цитокиновых рецепторов, как IL-4R или G-CSFR. Vigon et al., выше слил внеклеточный домен G-CSFR с трансмембранным и цитоплазматическим доменами с-*mpl*. IL-3-зависимую клеточную линию, BAF/B03 (Ba/F3), подвергли трансфекции химерой G-CSFR/*mpl* наряду с контролем полной длины G-CSFR. Клетки, зараженные химерой, росли одинаково хорошо в присутствии цитокина IL-3 и G-CSF. Подобным образом, клетки, зараженные G-CSFR, также хорошо росли в присутствии IL-3 и G-CSF. Все клетки погибали в отсутствие агентов роста. Подобный опыт был проведен Skoda et al., EMBO J., 12(7):2645-2653 (1993), в котором внеклеточный и трансмембранный домены человеческого рецептора IL-4 (hIL-4-R) были слиты с цитоплазматическим доменом *mpl* мыши и этой химерой была заражена IL-3-зависимая клеточная линия Ba/F3 мыши. Клетки Ba/F3, зараженные обычным hIL-4-R, размножались нормально в присутствии как IL-4, так и IL-3. Клетки Ba/F3, зараженные hIL-4-R/*mpl*, размножались нормально в присутствии hIL-4 (независимо от присутствия или отсутствия IL-3), показав, что в клетках Ba/F3 цитоплазматический домен *mpl* содержит все элементы, необходимые для передачи пролиферативного сигнала.

Эти химерические эксперименты продемонстрировали способность цитоплазматического домена *mpl* к пролиферативной сигнализации, но не показали, может ли внеклеточный домен *mpl* связывать лиганды. Эти результаты допускают как минимум две возможности, а именно, что *mpl* является рецептором с одной цепью (класса 1), подобно EPO-R или G-CSFR, или он является сигналопередающим с-подэлементом (класс 3), требующим р-подэлемента типа IL-3 (Skoda et al. выше).

#### VI. Лиганд *mpl* - тромбопоэтин (TPO)

Как описано выше, было сделано предположение, что, сыворотка содержит единственный в своем роде агент, называемый тромбопоэтином (TPO), который действует синергически с различными другими цитокинами, ускоряя рост и развитие мегакариоцитов. Ни одного такого природного агента до сих пор не было выделено из сыворотки или другого источника, хотя предпринималось большое количество попыток разными группами ученых. Даже если до сих пор неизвестно, способен ли *mpl* непосредственно связываться с агентом стимуляции мегакариоцитов, последние опыты показали, что *mpl* участвует в переносе пролиферативного сигнала от агента или агентов, найденных в сыворотке пациентов с апластическим костным мозгом (Methia et al., Blood, 82(5):1395-1401 [1993]).

То, что единственный сывороточный колониеобразующий агент, отличный от IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, SCF, EPO, G-CSF и GM-CSF, переносит пролиферативный сигнал через *mpl*, очевидно из исследования распределения с-*mpl* в простейших и промежуточных кроветворных клеточных линиях и из исследований обратного *mpl* в одной из этих клеточных линий.

Используя обратную транскриптазу (RT)-PCR в иммуно-очищенных человеческих кроветворных клетках, Methia et al., выше, продемонстрировал, что сильные сигналы *mpl* mRNA были найдены только в очищенных клетках CD34<sup>+</sup>, мегакариоцитах и тромбоцитах. Клетки CD34<sup>+</sup>, очищенные от костного мозга (BM), составляют около 1% от всех клеток BM и обогащаются в присутствии простейших и промежуточных прародительских клеток всех видов (т.е., эритроидов, грануломакрофагов и мегакариоцитов).

Обратные олигонуклеотиды *mpl*, как было показано, подавляют образование мегакариоцитарных колоний от плюрипотенциальных клеток CD34<sup>+</sup>, культивированных в сыворотке от пациентов с аплазией костного мозга [богатый источник мегакариоцито-колониестимулирующей активности (МК-CSA)]. Те же самые обратные олигонуклеотиды не оказывают никакого влияния на образование колоний эритроидов или грануломакрофагов.

Связываются ли непосредственно *mpl* с лигандами, и способствует ли мегакариоцитопозу указанный агент сыворотки при посредстве *mpl*, было до сих пор неизвестно. Однако было сделано предположение, что, если *mpl* действительно непосредственно связывается с лигандами, то его аминокислотная последовательность должна быть высококонсервированной и иметь перекрестную реакционную способность с различными видами благодаря большой степени идентичности последовательностей во внеклеточных доменах *mpl* человека и мыши [Vigon et al., выше (1993)].

#### VII. Объекты изобретения

В свете вышеизложенного можно сделать выводы, что в данной области существует текущая необходимость выделить и идентифицировать молекулы, способные стимулировать размножение, видоизменение и развитие кроветворных клеток, особенно мегакариоцитов или их предшественников, для терапевтического использования при лечении тромбоцитопении. Считается, что такой молекулой является лиганд *mpl*, и, таким образом, существует следующая необходимость - выделить такой лиганд (лиганды) для оценки его роли в клеточном росте и видоизменении.

В соответствии с этим, объектом данного изобретения является получение фармацевтически чистой молекулы, способной стимулировать размножение, видоизменение и/или развитие мегакариоцитов в зрелую тромбоцито-продуцирующую форму.

Вторым объектом является производство молекулы в форме, пригодной для терапевтического использования при лечении расстройств кроветворения, в частности, тромбоцитопении.

Следующим объектом настоящего изобретения является получение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей лиганды такого белка и использование этих молекул нуклеиновой кислоты для производства связующих лигандов *mpl* в рекомбинантной клеточной культуре для диагностики) и терапевтического использования.

Еще одним объектом является получение производных и модифицированных форм лигандов белка, включающих варьируемые последовательности аминокислот, варьируемые гликопротеиновые формы и их ковалентные производные.

Дополнительным объектом является получение варьируемых полипептидных форм, сочетающих лиганды *mpl* с остатками аминокислот и заместителями, из последовательности ЕРО для производства белка, способного регулировать размножение и рост прародительских клеток как тромбоцитов, так и красных кровяных телец.

Еще одним дополнительным объектом является получение иммуногенов для увеличения количества антител против лигандов *mpl*, или их слитых форм, а также для получения антител, способных связывать такие лиганды.

Эти и другие объекты изобретения будут понятны после рассмотрения детального описания в целом.

Объекты изобретения достигаются путем получения изолированного белка<sup>7</sup> способствующего размножению и развитию мегакариоцитопозических клеток млекопитающих, называемого "лиганд *mpl*" (ML) или "тромбопоэтин" (ТРО), способного стимулировать размножение, видоизменение и/или развитие мегакариоцитов в зрелую тромбоцито-продуцирующую форму.

Этот в основном гомогенный белок может быть в чистом виде выделен из натурального источника способом, включающим (1) контактирование плазмы источника, содержащей молекулы лиганда *mpl*, которые должны быть очищены, с иммобилизованным рецепторным полипептидом, в частности, полипептидом *mpl* или полипептидом слитого *mpl*, иммобилизованным на подложке, в условиях, при которых молекулы лиганда *mpl*, которые должны быть очищены, селективно адсорбируются на иммобилизованном рецепторном полипептиде, (2) промывку иммобилизованного рецепторного полипептида и его подложки для удаления неадсорбированного материала и (3) элюирование молекул лиганда *mpl* из иммобилизованного рецепторного полипептида, на котором они адсорбированы, элюирующим буферным раствором. Предпочтительным натуральным источником является плазма или моча млекопитающего, содержащая лиганд *mpl*. Как вариант, млекопитающее может страдать аплазией, и иммобилизованный рецептор представляет собой слияние *mpl*-IgG.

Как вариант, белок, способствующий размножению и развитию мегакариоцитопозических клеток, представляет собой изолированный, в основном гомогенный полипептид лиганда *mpl*, полученный синтетическими или рекомбинантными средствами.

Полипептид "лиганда *mpl*" или "ТРО" данного изобретения предпочтительно имеет как минимум 70% идентичности всей последовательности ДНК с последовательностью аминокислот в высокоочищенном, в основном гомогенном полипептиде лиганда *mpl* свиньи и как минимум 80% идентичности последовательности ДНК с "ЕРО-доменом" полипептида лиганда *mpl* свиньи. Как вариант, лиганд *mpl* данного изобретения представляет собой зрелый человеческий лиганд *mpl* (hML), имеющий зрелую аминокислотную последовательность, представленную на Фиг.1 (номер последовательности: 1), или один из его вариантов или посттранскрипционных модифицированных форм, или белок, имеющий 80% идентичности с последовательностью зрелого человеческого лиганда *mpl*. Возможно, вариант лиганда *mpl* представляет собой фрагмент, в частности, аминоконечный или фрагмент "ЕРО-домена" зрелого человеческого лиганда *mpl*. Предпочтительно аминоконечный фрагмент сохраняет практически всю последовательность человеческого ML между первым и четвертым цистеиновыми остатками, но может содержать существенные дополнения, делеции или заместители снаружи этого участка. Согласно этому варианту осуществления изобретения, фрагментарный полипептид может быть представлен формулой

X-hML(7-151)-Y,

где hML(7-151) представляет собой аминокислотную последовательность человеческого ТРО (hML) от Cys<sup>7</sup> до Cys<sup>151</sup> включительно; X представляет собой аминокислотную группу Cys<sup>7</sup> или один или более аминоконечных остатков аминокислоты зрелого hML, или добавление аминокислотного остатка, такого как Met, Tyr, или ведущие последовательности, содержащие, например, участки протеолитического расщепления (фактор Ха или тромбин); Y представляет собой карбоксильную конечную группу Cys<sup>151</sup> или один или более карбокси-конечных остатков аминокислоты зрелого hML, или добавление аминокислотного остатка.

Как вариант, полипептид лиганда *mpl* или его фрагмент может быть слитым в гетерологичный полипептид (химеру). Предпочтительный гетерологичный полипептид представляет собой цитокин, колониестимулирующий агент или интерлейкин или их фрагменты, в частности, кит-лиганд (KL), IL-1, IL-3, IL-4; IL-6, IL-11, SCF, EPO, GM-CSF или LIF. Как вариант, предпочтительным гетерологичным полипептидом может быть иммуноглобулиновая цепь, в частности, человеческий IG1, IG2, IG3, IG4, IGA, IGE, IGD, IGM - или их фрагменты, в частности, содержащие постоянные домены жесткой цепи IgG.

Другой аспект данного изобретения представляет композицию, включающую изолированный агонист *mpl*, биологически активный и предпочтительно способный стимулировать включение меченых нуклеотидов (например, <sup>3</sup>H-тимидина) в ДНК IL-3-зависимых клеток Ba/F3, зараженных человеческим *mpl*. Как вариант, агонистом *mpl* является биологически активный лиганд *mpl*, предпочтительно способный стимулировать включение <sup>35</sup>S в циркулирующие тромбоциты в анализе мышинных ответных тромбоцитов. Подходящие агонисты *mpl* включают hML<sub>153</sub>, hML(R153A, R154A), hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML и pML2 или их фрагменты.

В другом варианте изобретение предлагает изолированное антитело, способное связываться с лигандами *mpl*. Изолированное антитело, способное связываться с лигандами *mpl*, может, как вариант, быть слито со вторым полипептидом, и антитело или его слитая форма может быть использовано для выделения лиганда *mpl* в чистом виде из источника, как описано выше для иммобилизованного *mpl*. В дальнейшем развитии этого варианта изобретение предлагает способ обнаружения лиганда *mpl* вне организма или в организме, включающий контактирование антитела с образцом, в частности, образцом сыворотки, подозреваемой в содержании лиганда, и обнаружение его в том случае, если связывание произойдет.

В следующем варианте изобретение предлагает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей лиганд *mpl* или его фрагменты, которая может быть, как вариант, помечена обнаруживаемым элементом, и молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность оснований, комплементарную или гибридизирующуюся в определенном диапазоне условий (от умеренно до высоко строгих) с молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность оснований, кодирующую лиганд *mpl*. Предпочтительными являются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие человеческие, свиные и мышинные лиганды *mpl* и включающие РНК и ДНК с геномами и кДНК. В дальнейшем развитии этого варианта изобретение предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, представляющую собой ДНК, кодирующую лиганд *mpl* и включающую повторяемый вектор, в котором ДНК оперативно связана с контрольными последовательностями, распознаваемыми хозяином, трансформируемым вектором. Как вариант, ДНК представляет собой кДНК с последовательностью оснований, представленной на Фиг.1: 5'-3' (номер последовательности: 2), 3'-5' или ее фрагменты. Далее этот аспект включает клетки хозяина, предпочтительно клетки СНО, трансформированные вектором, и способ использования ДНК для влияния на продуцирование лиганда *mpl*, предпочтительно включающий экспрессию кДНК, кодирующей лиганд *mpl*, в культуре трансформированных клеток хозяина и извлечение лиганда *mpl* из клеток хозяина или среды культуры клеток хозяина. Лиганд *mpl*, приготовленный таким образом, предпочтительно представляет собой человеческий лиганд *mpl*.

Далее изобретение включает способ лечения млекопитающих, страдающих расстройством кроветворения, в частности, тромбоцитопенией, предусматривающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества лиганда *mpl*. Возможно введение лиганда *mpl* в сочетании с цитокином, в частности, колониестимулирующим агентом или интерлейкином. Предпочтительные колониестимулирующие агенты или интерлейкины включают кит-лиганд (KL), LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11.

Далее изобретение включает процесс выделения в чистом виде ТРО (ML) из ТРО-продуцирующего микроорганизма, включающий:

- (1) разрушение или лизирование-клеток, содержащих ТРО,
- (2) возможно, отделение растворимого материала от нерастворимого материала, содержащего ТРО,
- (3) солюбилизация ТРО в нерастворимом материале солюбилизирующим буфером,
- (4) отделение солюбилизованного ТРО от других растворимых и нерастворимых материалов,
- (5) укладка ТРО в окислительно-восстановительном буфере и
- (6) отделение сложенного ТРО от развернутого ТРО.

Этот процесс разработан для солюбилизации нерастворимого материала, содержащего ТРО, хаотропическим агентом, где хаотропический агент выбирается из соли гуанидина, тиоцианата натрия или мочевины. Далее процесс предусматривает отделение солюбилизованного ТРО от других растворимых и нерастворимых материалов в один или несколько этапов, выбранных из центрифугирования, гелефильтрации и хроматографии обратной фазы. Этап укладки ТРО проводится в окислительно-восстановительном буфере, содержащем как окислительный, так и восстановительный агенты. Как правило, окислителем является кислород или соединение, содержащее минимум одну дисульфидную связь, а восстановителем - соединение, содержащее минимум один свободный сероводород. Предпочтительно окислитель выбирается из окисленного глутатиона (GSSG) и цистина, а восстановитель - из восстановленного глутатиона (GSH) и цистеина. Наиболее предпочтителен вариант, когда окислителем является GSSG, а восстановителем - GSH. Предпочтительно также, чтобы молярная концентрация окислителя была равна или превосходила молярную концентрацию восстановителя. Окислительно-восстановительный буфер дополнительно содержит детергент, предпочтительно выбранный из CHAPS или CHAPSO, в количестве как минимум 1%. Окислительно-восстановительный буфер дополнительно содержит хлорид натрия, предпочтительно с концентрацией от 0,1 до 0,5М, и глицерин, предпочтительно с концентрацией более 15%. pH буфера предпочтительно лежит в диапазоне от 7,5 до 9,0, и этап укладки проводится при 4 градусах в течение 12-48 часов. Этот этап обеспечивает получение биологически активного ТРО, в котором между Cys, ближайшим к конечному амину домена EPO, и Cys, ближайшим к конечному карбоксилу, образуется дисульфидная связь.

Далее изобретение включает процесс выделения в чистом виде биологически активного ТРО из микроорганизма, включающий:

- (1) лизирование как минимум внеклеточной мембраны микроорганизма,
- (2) обработка лизата, содержащего ТРО, хаотропическим агентом,
- (3) укладка ТРО и
- (4) отделение неочищенного ТРО и развернутого ТРО от сложенного ТРО.

Фиг.1 показывает выведенную последовательность аминокислот (номер последовательности: 1) в кДНК человеческого лиганда mPl (hML) и кодированную последовательность нуклеотидов (номер последовательности: 2). Нуклеотиды пронумерованы в начале каждой строки. Нетранслируемые участки 5' и 3' обозначены прописными буквами. Аминокислотные остатки пронумерованы над последовательностью, начиная от последовательности Ser 1 зрелого белка лиганда mPl (ML). Границы предполагаемого экзона 3 обозначены стрелками, а потенциальные участки N-гликозилирования обведены рамками. Цистеиновые остатки обозначены точками над последовательностью. Подчеркнутые последовательности соответствуют N-конечным последовательностям, найденным в лиганде mPl, выделенном из плазмы свиньи.

Фиг.2 показывает процедуру, используемую для инкорпорации в лиганд mPl  $^3\text{H}$ -тимидина. Чтобы определить присутствие лиганда mPl из различных источников, клетки mPl P Ba/F3 были лишены IL-3 в течение 24 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. После IL-3-голодания клетки распределили в 96-луночных чашках с разбавленными образцами или без них, и подвергли культивированию 24 часа в инкубаторе клеточных культур. Затем добавили 20мкл среды RPMI, не содержащей сыворотки и содержащей 1мкКи  $^3\text{H}$ -тимидина, в каждую лунку на последние 6-8 часов. Затем клетки собрали в 96-луночные фильтровальные чашки и промыли водой. Фильтры сосчитали.

Фиг.3 показывает действие проназы, DTT и тепла на способность APP стимулировать размножение клеток Ba/F3-mPl. При изучении действия проназы добавляли проназу (Boehringer Mannheim) или альбумин бычьей сыворотки к Affi-gel10 (Biorad) и выдерживали отдельно с APP в течение 18 часов при 37°C. Затем удалили смолы путем центрифугирования и исследовали надосадочную жидкость. APP также нагревали до 80°C в течение 4 минут или обрабатывали 100мкМ DTT с последующим диализом в PBS.

Фиг.4 показывает элюирование активности лиганда mPl в колонках Phenyl-Toyopearl, Blue-Sepharose и Ultralink-mPl. Фракции 4-8, элюированные из колонки mPl-сродства, были пиковыми.

Фиг.5 показывает SDS-PAGE-элюирование фракций Ultralink-mPl. К 200мкл каждой фракции 2-8 добавили 1мл ацетона, содержащего 1мМ HCl при -20°C. Через 3ч. при -20°C образцы центрифугировали, а результирующие гранулы дважды промыли ацетоном при -20°C. Затем ацетоновые гранулы растворили в 30мкл SDS-солюбилизирующего буфера, обработали 100мкМ DTT и нагрели при 90°C в течение 5 минут. После этого образцы растворили в 4-20% геле SDS-полиакриламида и визуализировали белок при помощи серебряного окрашивания.

Фиг.6 показывает элюирование активности лиганда mPl в SDS-PAGE. Фракцию 6 из колонки mPl-сродства растворили в 4-20% геле SDS-полиакриламида в невосстанавливающих условиях. После электрофореза гель разрезали на 12 равных частей и электроэлюировали, как описано в примерах. Электроэлюированные образцы подвергли диализу в PBS и анализу при разбавлении 1/20. Стандартом M<sub>r</sub> при калибровке геля был стандарт Novex Mark 12.

Фиг.7 показывает влияние APP, лишенной лиганда mPl, на мегакариоцитопоз человека. APP, лишенная лиганда mPl, была приготовлена путем прохождения 1мл через 1-мл колонку mPl-сродства (700мкг mPl-IgG/мл NHS-superose, Pharmacia). Культуры человеческих периферических стволовых клеток обработали 10% APP или 10% APP, лишенной лиганда mPl, и культивировали 12 дней. Мегакариоцитопоз проанализировали количественно, как описано в примерах.

Фиг.8 показывает влияние mPl-IgG на стимулирование человеческого мегакариоцитопоза при помощи APP. Культуры человеческих периферических стволовых клеток обработали 10% APP и культивировали 12 дней. В 0, 2 и 4-й дни добавляли mPl-IgG (0,5мкг) или ANP-R-IgG (0,5мкг). Мегакариоцитопоз через 12 дней проанализировали количественно, как описано в примерах. Графики построены по средним значениям параллельных образцов, а в скобках приведены их действительные значения.

Фиг.9 показывает обе цепи фрагмента человеческой геномной ДНК (390 bp [нуклеотидных пар]), кодирующей лиганд mPl. Показаны выведенная аминокислотная последовательность "экзона 3" (номер последовательности: 3), кодирующая последовательность (номер последовательности: 4) и ее комплемент (номер последовательности: 5).

Фиг.10 показывает выведенную аминокислотную последовательность зрелого человеческого лиганда mPl (hML) (номер последовательности: 6) и зрелого человеческого эритропоэтина (номер последовательности: 7). Предсказанная аминокислотная последовательность для человеческого лиганда mPl совмещена с последовательностью человеческого эритропоэтина. Идентичные аминокислоты обведены рамками, а пустоты, введенные для оптимального совмещения, показаны пунктиром. Потенциальные участки N-гликозилирования подчеркнуты сплошной линией для hML и штриховой линией для hEPO. Два цистеина, важных для активности эритропоэтина, отмечены большими точками.

Фиг.11 показывает выведенную аминокислотную последовательность изоформ зрелого человеческого лиганда mPl: hML (номер последовательности: 6), hML2 (номер последовательности: 8), hML3 (номер последовательности: 9) и hML4 (номер последовательности: 10). Идентичные аминокислоты обведены рамками, а пустоты, введенные для оптимального совмещения, показаны пунктиром.

Фиг.12A, 12B и 12C показывают влияние человеческого лиганда mPl на размножение клетки Ba/F3-mPl вне организма (A). Мегакариоцитопоз количественно оценили с использованием радиоактивного изотопа в моноклональном антителе IgG мыши, специфическом для гликопротеина GPIIb/IIIa (B) мегакариоцита, а тромбоцитопоз мыши измеряли путем анализа ответных тромбоцитов.

Клетки 293 были подвергнуты трансфекции методом CaPO<sub>4</sub> [Gorman, C in DNA Cloning: A New Approach 2:143-190 (1985)] вектором pRK5 отдельно, pRK5-hML или pRK5-ML<sub>153</sub> в течение ночи (pRK5-ML<sub>153</sub> генерировали введением терминирующего кодона после остатка 153 в hML при помощи PCR). Затем кондиционировали среду в течение 36 часов и исследовали на стимуляцию размножения клеток Ba/F3-mPl, как описано в Примере 1 (A) или человеческий мегакариоцитопоз вне организма (B). Мегакариоцитопоз количественно оценили с использованием радиоактивного изотопа  $^{125}\text{I}$  в моноклональном антителе IgG (HP1-1D) мыши, специфическом для гликопротеина GPIIb/IIIa (B) мегакариоцита, как описано (Grant et al., Blood 69:1334-1339 [1987]). Действие частично очищенного рекомбинантного ML (rML) на вырабатывание

тромбоцитов в организме (C) определяли с использованием анализа ответных тромбоцитов, описанного McDonald, T.P. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144:1006-10012 (1973). Частично очищенный gML приготовили из 200мл кондиционированной среды, содержащей рекомбинантный ML. Среду пропустили через 2-мл колонку Blue-Sepharose, уравновешенную в PBS, а колонку промыли PBS и элюировали PBS, содержащим по 2M мочевины и NaCl. Активную фракцию подвергли диализу в PBS и обработали 1мг/мл BSA без эндотоксина, образцы содержали менее одной единицы эндотоксина/мл. Мышам ввели 64000, 32000 или 16000 единиц gML или одного наполнителя. Каждая группа состояла из шести мышей. Полученные значения и стандартные отклонения для каждой группы показаны на рисунке. Величины  $\rho$  определяли по средним значениям двух сравнительных T-тестов.

Фиг.13 сравнивает действие изоформ и вариантов человеческого лиганда mrl на размножение клеток Ba/F3. Были исследованы hML, ложный опыт, hML2, hML3, hML(R153A, R154A) при различном титре, как описано в Примере 1.

Фиг.14A, 14B и 14C показывают выведенную аминокислотную последовательность (номер последовательности: 1) человеческого лиганда mrl (hML) или человеческого TPO (hTPO) и кодирующую последовательность человеческой геномной ДНК (номер последовательности: 11). Нуклеотиды и аминокислотные остатки пронумерованы в начале каждой строки.

Фиг.15 показывает SDS-PAGE очищенного 293-rhML<sub>332</sub> и очищенного 293-rhML<sub>153</sub>.

Фиг.16 показывает последовательность нуклеотидов: кДНК (номер последовательности: 12) и выведенная аминокислотная последовательность (номер последовательности: 13) открытой рамки считывания изоформы ML мыши. Эта зрелая изоформа лиганда mrl мыши содержит 331 аминокислотный остаток, на 4 остатка меньше, чем в предполагаемом mML полной длины, и поэтому обозначена mML2. Нуклеотиды пронумерованы в начале каждой строки. Аминокислотные остатки пронумерованы над последовательностью, начиная с Ser 1. Потенциальные участки N-гликозилирования подчеркнуты. Цистеиновые остатки отмечены точками над последовательностью.

Фиг.17 показывает последовательность кДНК (номер последовательности: 14) и предсказанную белковую последовательность (номер последовательности: 15) этой изоформы ML мыши. Нуклеотиды пронумерованы в начале каждой строки. Аминокислотные остатки пронумерованы над последовательностью, начиная с Ser 1. Эта зрелая изоформа лиганда mrl мыши содержит 335 аминокислотных остатков и считается лигандом mrl полной длины, поэтому обозначена mML. Последовательность сигналов отмечена пунктирным подчеркиванием, а возможная точка расщепления указана стрелкой. Нетранслированные участки 5' и 3' обозначены прописными буквами. Две обнаруженные делеции, являющиеся результатом попеременного сращения (mML2 и mML3), подчеркнуты. Четыре цистеиновых остатка отмечены точками. Семь потенциальных участков N-гликозилирования обведены рамками.

Фиг.18 сравнивает выведенную аминокислотную последовательность изоформы человеческого ML hML3 (номер последовательности: 9) и изоформу ML мыши, обозначенную mML3 (номер последовательности: 16). Предсказанная аминокислотная последовательность для человеческого лиганда mrl совмещена с последовательностью лиганда mrl мыши. Идентичные аминокислоты обведены рамками, а пустоты, введенные для оптимального совмещения, показаны пунктиром. Аминокислотные остатки пронумерованы в начале каждой строки.

Фиг.19 сравнивает выведенные аминокислотные последовательности зрелых изоформ мышинного ML (номер последовательности: 17), свиного ML (номер последовательности: 18) и человеческого ML (номер последовательности: 6). изоформу ML мыши, обозначенную mML3 (номер последовательности: 16). Аминокислотные последовательности совмещены с наличием пустот, введенных для оптимального совмещения и обозначенных пунктиром. Аминокислоты пронумерованы в начале каждой строки, а идентичные остатки обведены рамками. Потенциальные участки N-гликозилирования обведены рамками с тенью. Цистеиновые остатки отмечены точками. Заоксерсированные диосновные аминокислотные раппорты, представляющие потенциальные участки расщепления протеазы, подчеркнуты. Четыре обнаруженные во всех трех видах последовательностей аминокислотные делеции (ML2) обведены жирными рамками.

Фиг.20 показывает последовательность кДНК (номер последовательности: 19) и предсказанную последовательность зрелого белка (номер последовательности: 18) изоформы свиного ML (pML). Эта зрелая изоформа свиного лиганда mrl содержит 332 аминокислотных остатка и считается свиным лигандом mrl полной длины, обозначаемым pML. Нуклеотиды пронумерованы в начале каждой строки. Аминокислотные остатки пронумерованы над последовательностью, начиная с Ser 1.

Фиг.21 показывает последовательность кДНК (номер последовательности: 20) и предсказанную последовательность зрелого белка (номер последовательности: 21) изоформы свиного ML (pML2). Эта зрелая изоформа свиного лиганда mrl содержит 328 аминокислотных остатков и представляет собой форму свиного лиганда mrl с четырьмя делециями, обозначенную pML2. Нуклеотиды пронумерованы в начале каждой строки. Аминокислотные остатки пронумерованы над последовательностью, начиная с Ser 1.

Фиг.22 сравнивает выведенную аминокислотную последовательность изоформы свиного ML полной длины pML (номер последовательности: 18) и изоформу свиного ML, обозначенную pML2 (номер последовательности: 21). Предсказанная аминокислотная, последовательность для pML совмещена с последовательностью pML2. Идентичные аминокислоты обведены рамками, а пустоты, введенные для оптимального совмещения, показаны пунктиром. Аминокислотные остатки пронумерованы в начале каждой строки.

Фиг.23 показывает особенности pSV15.ID.LL.MLORF плазмиды ("полной длины", или TPO<sub>332</sub>), используемого для трансфекции хозяйских клеток CHO-DP12 с целью получения CHO-rhTPO<sub>332</sub>.

Фиг.24 показывает особенности pSV15.ID.LL.MLEPO-D плазмиды ("усеченной", или TPO<sub>153</sub>), используемого для трансфекции хозяйских клеток CHO-DP12 с целью получения CHO-rhTPO<sub>153</sub>.

Фиг.25А, 25В, 25С показывают влияние *E. coli*-rhTPO (Met<sup>1</sup>,153) на тромбоциты (А), красные кровяные тельца (В) и белые кровяные тельца (С) нормальной мыши. Двум группам по 6 самок мышей C57 В6 вводили ежедневно буфер PBS или 0,3мкг *E. coli*-rhTPO(Met<sup>1</sup>,153) (100мкл sc.). В 0 и 3-7 дни делали отбор 40мкл крови из глазничной вены. Эту кровь немедленно разбавили 10мл промышленного разбавителя и провели полный анализ на Serrono Baker Hematology Analyzer 9018. Данные представлены в виде полученных величин +/- стандартная ошибка.

Фиг.26А, 26В, 26С показывают влияние *E. coli*-rhTPO(Met<sup>1</sup>,153) на тромбоциты (А), красные кровяные тельца (В) и белые кровяные тельца (С) сублетально облученной мыши. Две группы по 10 самок мышей C57 В6 сублетально облучили 750сГр гамма-излучения от источника <sup>137</sup>Cs и вводили ежедневно буфер PBS или 3,0мкг *E. coli*-rhTPO (Met<sup>1</sup>,153) (100мкл sc). В нулевой день и в последующие промежуточные моменты времени делали отбор 40мкл крови из глазничной вены. Эту кровь немедленно разбавили 10мл промышленного разбавителя и провели полный анализ на Serrono Baker Hematology Analyzer 9018. Данные представлены в виде полученных величин +/- стандартная ошибка.

Фиг.27А, 27В, 27С показывают влияние CHO-rhTPO<sub>332</sub> на тромбоциты (А), красные кровяные тельца (эритроциты) (В) и белые кровяные тельца (лейкоциты) (С) нормальной мыши. Двум группам по 6 самок мышей C57 В6 вводили ежедневно буфер PBS или 0,3мкг CHO-rhTPO<sub>332</sub> (100мкл sc). В 0 и 3-7 дни делали отбор 40мкл крови из глазничной вены. Эту кровь немедленно разбавили 10мл промышленного разбавителя и провели полный анализ на Serrono Baker Hematology Analyzer 9018. Данные представлены в виде полученных величин +/- стандартная ошибка.

Фиг.28 показывает кривые отклика на дозу для различных форм rhTPO, полученных из различных клеточных линий. Кривые отклика на дозу были построены для rhTPO из следующих клеточных линий: hTPO<sub>332</sub> из CHO (полной длины, из клеток яичника китайского хомяка); hTPO(Met<sup>1</sup>,153) (усеченная форма *E. coli*-производного с N-конечным метионином); hTPO<sub>332</sub> (TPO полной длины, из человеческих клеток 293); Met-less 155 *E. coli* (усеченная форма [rhTPO<sub>155</sub>] без конечного метионина из *E. coli*). Группам из 6 самок мышей C57 В6 в течение 7 дней ежедневно вводили различные rhTPO в зависимости от группы. Каждый день делали отбор 40мкл крови из глазничной вены для полного анализа. Представленные данные показывают максимальные эффекты, наблюдаемые в различных группах, и, за исключением (met 153 *E. coli*), эти эффекты наблюдались на 7-й день обработки. В вышеупомянутой группе (met 153 *E. coli*), максимальный эффект наступил на 5-й день. Данные представлены в виде полученных величин +/- стандартная ошибка.

Фиг.29 показывает кривые отклика на дозу, сравнивающие активность форм полной длины и "усеченных" форм rhTPO, полученных в клетках CHO, с усеченной формой из *E. coli*. Группам из 6 самок мышей C57 В6 в течение 7 дней ежедневно вводили 0,3мкг rhTPO различных типов. Во 2-7 дни сделали отбор 40мкл крови из глазничной вены для полного анализа. Группы обрабатывались усеченной формой TPO TPO<sub>153</sub> из *E. coli*; TPO<sub>332</sub> (смешанная фракция) - TPO полной длины, содержащий около 80-90% формы полной длины и 10-20% усеченных форм; TPO<sub>332</sub> (фракция 30К) - очищенная усеченная фракция из первоначального "смешанного" препарата; TPO<sub>332</sub> (фракция 70К) - очищенная фракция полной длины из первоначального "смешанного" препарата. Данные представлены в виде полученных величин +/- стандартная ошибка.

Фиг.30 наглядно представляет способ анализа KIRA ELISA для измерения TPO. Рисунок показывает химеру MPL/Rse.gD и важные участки прародительских рецепторов, а также окончательную структуру (правая часть рисунка) и блок-схему (левая часть рисунка) последовательных этапов анализа.

Фиг.31 представляет собой блок-схему для анализа KIRA ELISA, показывающую каждый этап процесса.

Фиг.32А-32L представляет последовательность нуклеотидов (номер последовательности: 22) вектора экспрессии pSV117.ID.LL, используемого для экспрессии Rse.gD в Примере 17.

Фиг.33 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP1.

Фиг.34 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP21.

Фиг.35 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP151.

Фиг.36 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP202.

Фиг.37 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP172.

Фиг.38 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP210.

Фиг.39 представляет собой таблицу пяти лучших экспрессии клонов из плазмидного банка rMP210 (идентификационные номера последовательностей: 23, 24, 25, 26, 27 и 28).

Фиг.40 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP41.

Фиг.41 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP57.

Фиг.42 дает схематическое представление приготовления плазмиды rMP251.

Детальное описание изобретения

Определения

В целом, следующие слова или фразы при использовании в описании, примерах и формуле изобретения имеют следующие определения.

"Хаотропический агент" - относится к соединениям, которые в водном растворе и при соответствующих концентрациях могут вызывать изменения в пространственной конфигурации или конформации белка путем как минимум частичного разрыва связей, ответственных за поддержание нормальной вторичной или третичной структуры белка. Такие соединения включают, например, мочевины, гуанидин-HCl и тиоцианат натрия. Для оказания влияния на конформацию белка обычно требуются высокие концентрации, обычно 4-9М, этих соединений.

"Цитокин" - родовой термин для белков, высвобожденных из одной клеточной популяции, которые действуют на другую клетку как внутриклеточные посредники. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. К цитокинам можно причислить гормоны роста, инсулиноподобные агенты роста, человеческий гормон роста, N-метионильный человеческий гормон роста, бычий гормон роста, гормон парашитовидной железы, тироксин, инсулин, проинсулин, релаксин, прорелаксин, гликопротеиновые гормоны, такие как гормон стимуляции фолликулов (FSH), гормон стимуляции

щитовидной железы (TSH) и лейтинизирующий гормон (LH), агент гематопоезического роста, агент гепатического роста, агент роста фибробластов, пролактин, плацентальный лактоген, р-агент некроза опухолей (TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ ), мышинный гонадотропин-связанный пептид, ингибин, активин, агент васкулярного эндотелиального роста, интегрин, агенты нервного роста, такие как NGF- $\alpha$ , агент роста тромбоцитов, трансформирующие агенты роста (TGF), такие как TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ , инсулиноподобные агенты роста I и II, эритропоэтин-стимулирующие агенты (EPO), остеоиндуктивные агенты, интерфероны, такие как интерферон -  $\alpha$ , - $\beta$  и  $\gamma$ , колониестимулирующие агенты (CSF), такие как макрофаг-CSF (M-CSF), гранулоцито-макрофаг-CSF (GM-CSF), гранулоцито-CSF (G-CSF), интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12 и другие полипептидные агенты, включая LIF, SCF и кит-лиганды. Вышеупомянутые термины подразумевают белки, полученные из натуральных источников или рекомбинантных клеточных структур. Эти термины охватывают также биологически активные эквиваленты, например, различающиеся в аминокислотной последовательности одной или, несколькими аминокислотами или типом или степенью гликозилирования.

Термины "лиганд mrl", "полипептид лиганда mrl", "ML", "тромбопоэтин" или "TPO" используются здесь поочередно и включают любой полипептид, который обладает свойством связываться с mrl, членом сверхсемейства цитокиновых рецепторов, и имеет биологические свойства ML, определенные ниже. Примерным биологическим свойством является способность стимулировать инкорпорацию меченых нуклеотидов (например, H-тимидина) в ДНК IL-3-зависимых клеток Ba/F3, зараженных человеческим mrl P. Другой пример биологического свойства - способность стимулировать инкорпорацию  $^{35}\text{S}$  в циркулирующие тромбоциты в анализе мышинных ответных тромбоцитов. Это определение включает полипептид, изолированный от источника лиганда mrl, такого как апластическая свиная плазма, описанная здесь, или другого источника, например, другого вида млекопитающего, включая человека, или приготовленный рекомбинацией или синтетическим способом, и включает также различные его варианты, в том числе функциональные производные, фрагменты, аллели, изоформы и аналоги.

"Фрагмент лиганда mrl" или "фрагмент TPO" - часть натурального зрелого лиганда mrl полной длины, или последовательность с одним или более удаленным аминокислотным остатком. Делеции аминокислотных остатков могут встречаться в любом месте пептида, включая азотные или карбоксильные окончания или внутреннюю часть. Фрагмент обладает как минимум одним биологическим свойством, общим с лигандом mrl. Типичные фрагменты лигандов mrl будут иметь последовательность как минимум 10, 15, 20, 25, 30 или 40 аминокислотных остатков, идентичных последовательностям лигандов mrl, изолированных из млекопитающего, включая лиганд, изолированный из апластической свиной плазмы или лиганд человека или мыши, в частности, его EPO-домен. Наглядные примеры N-конечных фрагментов - hML<sub>153</sub> или TPO(Met<sup>1</sup>1-153).

"Варианты лигандов mrl" или "варианты -последовательностей лигандов mrl" здесь означают биологически активные, как определено ниже, лиганды mrl, -имеющие менее 100% идентичности с лигандом mrl, изолированным из рекомбинантной клеточной культуры или апластической свиной плазмы, или человеческим лигандом, имеющим выведенную последовательность, описанную на Фиг.1 (номер последовательности: 1). В общем случае, биологически активный вариант лиганда mrl будет иметь как минимум около 70% идентичности аминокислотной последовательности с лигандом mrl, изолированным из апластической свиной плазмы или взрослой мыши или человеческим лигандом, или их фрагментами (см. Фиг.1, последовательность номер 1), предпочтительно минимум около 75%, более предпочтительно минимум около 80%, еще более предпочтительно минимум около 90% и наиболее предпочтительно минимум около 95%.

"Химерический лиганд mrl" - полипептид, включающий лиганд mrl полной длины или один или более его фрагментов, слитый или химически связанный со вторым гетерологичным полипептидом или одним или более его фрагментами. Химера будет обладать как минимум одним биологическим свойством, общим с лигандом mrl. Второй полипептид обычно является цитокином, иммуноглобулином или их фрагментом.

"Изолированный лиганд mrl", "высокоочищенный лиганд mrl" и "в основном-гомогенный лиганд mrl" - эти термины используются здесь поочередно и обозначают лиганд mrl, который был выделен в чистом виде из источника лиганда mrl или был приготовлен рекомбинантным или синтетическим способами и является достаточно отделенным от других пептидов или протеинов, (1) чтобы получить как минимум 15 и предпочтительно 20 аминокислотных остатков с N-окончаниями или с внутренней аминокислотной последовательностью, используя секвенатор с вращающейся чашкой или промысленный аминокислотный секвенатор или другие опубликованные методы, или (2) чтобы подвергнуться гомогенизации в SDS-PAGE в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием Coomassie blue или, предпочтительно, серебряного окрашивания. Гомогенность здесь означает менее 5% включений других белков из источника.

Термин "биологическое свойство", используемый в сочетании с термином "лиганд mrl" или "изолированный лиганд mrl", означает обладание тромбопоэтической активностью или эффекторной или антигенной функцией или активностью в организме, которая прямо или косвенно вызывается или выполняется лигандом mrl (в его природной или преобразованной конформации) или его фрагментом. Эффекторные функции включают способность mrl связываться с любым носителем, агонизм и антагонизм mrl, особенно способность передавать пролиферативные сигналы, включая репликацию, регуляторную функцию для ДНК, модуляцию биологической активности других цитокинов, активацию рецепторов (особенно цитокиновых), деактивацию, регуляцию роста или видоизменения клеток и т.д. Антигенная функция означает обладание эпитопом, или антигенным участком, который способен к перекрестной реакции с антителами, вводимыми против природного лиганда mrl. Принципиальная антигенная функция полипептида лиганда mrl состоит в том, что он связывается со сродством как минимум около  $10^6$  л/моль с антителом, вводимым против лиганда mrl, изолированного из апластической свиной плазмы. Как правило, сродство связи полипептидов составляет как минимум около  $10^7$  л/моль. Наиболее предпочтительно, чтобы антигенно-активный полипептид



лиганда tprl был полипептидом, который связывается с антителом, вводимым против лиганда tprl, имеющим одну из описанных выше эффекторных функций. Антитела, используемые для определения "биологической активности", представляют собой кроличьи поликлональные антитела, получаемые путем выделения лиганда tprl из рекомбинантной клеточной культуры или апластической свиной плазмы в адьюванте Freund, подкожного введения полученного вещества и усиления иммунного отклика путем внутрибрюшинного введения вещества до тех пор, пока титр антител лиганда tprl не станет постоянным.

Термин "биологическая активность", используемый в сочетании с термином "лиганд tprl" или "изолированный лиганд tprl", обозначает лиганд tprl или полипептид, который показывает тромбопоэтическую активность или обладает такой же эффекторной функцией, как лиганд tprl, изолированный из апластической свиной плазмы или экспрессированный в рекомбинантной клеточной культуре, описанной здесь. Принципиальная известная эффекторная функция лиганда tprl или пептида здесь - способность связываться с tprl и стимулировать инкорпорацию меченых нуклеотидов (например, <sup>3</sup>H-тимидина) в ДНК IL-3-зависимых клеток Ba/F3, зараженных человеческим tprl Р. Другой пример эффекторной функции - способность стимулировать инкорпорацию <sup>35</sup>S в циркулирующие тромбоциты в анализе мышиных ответных тромбоцитов. Еще одна известная эффекторная функция лиганда tprl - способность стимулировать вне организма человеческий мегакариоцитопоз, который может быть проанализирован с использованием радиоактивных изотопов в моноклональных антителах, специфических для гликопротеина GPIIb/IIIa мегакариocyта.

"Процент идентичности аминокислотной последовательности" относится к последовательности лиганда tprl, определенного здесь, как процентное содержание аминокислотных остатков в последовательности кандидата, которые идентичны остаткам лиганда tprl, изолированного из апластической свиной плазмы или лиганда мыши или человека, имеющего выведенную аминокислотную последовательность, описанную на Фиг.1 (номер последовательности: 1), после совмещения последовательностей и введения, если необходимо, пустот для достижения максимальной процентной идентичности, не рассматривая законсервированные<sup>v</sup> заместители как идентичные. Никакие N-окончания, C-окончания, внутренние добавления, делеции или вставки в последовательность лиганда tprl не должны вводиться в последовательность, как влияющие на ее идентичность или гомологичность. Так, примером биологически активных полипептидов лигандов tprl, имеющих идентичные последовательности, являются: лиганд препо-tprl, лиганд про-tprl и зрелый лиганд tprl.

"Микросеквенирование лиганда tprl" может быть осуществлено любым подходящим стандартным способом, если он достаточно чувствителен. В одном из таких способов высокоочищенный полипептид, полученный из геля SDS или полученный на последнем этапе HPLC, секвенируется непосредственно при помощи автоматизированной (фенилизотиоцианатной) деградации Edman с использованием газофазного секвенатора AppPеД Biosystems модели 470A, оснащенного фенилтиогидантионовым (PTH) аминокислотным анализатором 120A. Кроме того, подобным образом могут быть секвенированы фрагменты лиганда tprl, полученного химическим (например, при помощи CNBr, гидроксиламина, 2-нитро-5-тиоцианобензоата) или энзиматическим (например, при помощи трипсина, клострипаина, стафилококковой протеазы) расщеплением с последующей фрагментарной очисткой (например, HPLC). PTH-аминокислоты анализируются с использованием системы данных ChromPerfect (Justice Innovations, Palo Alto, CA). Интерпретация последовательности выполняется на компьютере VAX 11/785 Digital Equipment Co., как описано в Henzel et al., J. Chromatography, 404:41-52 (1987). Как вариант, слои фракций HPLC могут быть подвергнуты электрофорезу на 5-20% SDS-PAGE, перенесены на мембрану PVDF (ProBlott, AIB, Foster City, CA) и окрашены Coomassie Brilliant Blue (Matsudaira, D. Biol. Chem., 262:10035-10038 (1987). Специфический белок, идентифицированный окрашиванием, извлекается из образца, и проводится N-конечное секвенирование в газофазном секвенаторе, описанном выше. Для выстраивания внутренних последовательностей белка фракции HPLC высушиваются в условиях вакуума (Speedvac), ресуспендируются в соответствующих буферах и расщепляются цианоген-бромидом, Lys-специфическим энзимом Lys-C (Wako Chemicals, Richmond, VA) или Asp-N (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). После расщепления результирующие пептиды секвенируются в виде смеси, или после HPLC-разложения в колонке C4 развиваются при помощи пропанольного градиента в 0,1% TFA перед газофазным секвенированием.

"Тромбоцитопения" определяется как количество тромбоцитов ниже  $150 \times 10^9$  на литр крови.

"Тромбопоэтическая активность" определяется как биологическая активность, которая состоит из ускорения размножения, видоизменения и/или развития мегакариоцитов или их предшественников в тромбоцито-продуцирующую форму этих клеток. Эта активность может быть измерена различными методами анализа, включая метод ответных мышиных тромбоцитов в организме, метод индуцирования антигена поверхности клетки тромбоцита, с измерением его антитромбоцитным иммуноанализом (анти-GPIIb/IIIa) для мегакариобластической клеточной линии человеческой лейкемии (CMK), и метод индуцирования полиплоидизации в мегакариобластической клеточной линии (DAMI).

"Тромбопоэтин" (TPO) определяется как соединение, обладающее тромбопоэтической активностью или способностью повышать количество сывороточных тромбоцитов у млекопитающих. TPO предпочтительно способен увеличивать количество эндогенных тромбоцитов как минимум на 10%, более предпочтительно на 50%, и наиболее предпочтительно способен поднимать количество тромбоцитов в человеке до более чем  $150 \times 10$  на литр крови.

"Нуклеиновая кислота изолированного лиганда tprl" - РНК или ДНК, содержащая более 16 и предпочтительно 20 и более последовательных нуклеотидных оснований, которая кодирует биологически активный лиганд tprl или его фрагмент, комплементарная к ДНК или РНК или гибридизируется с ДНК или РНК и сохраняет стабильную связь в умеренно строгих и строгих условиях. Эта РНК или ДНК свободна от, как минимум, одной нуклеиновой кислоты источника контаминации, с которой она обычно связана в природном источнике, и предпочтительно в основном свободна от любых других РНК или ДНК млекопитающих. Фраза "свободна от, как минимум, одной нуклеиновой кислоты источника контаминации, с которой она обычно связана в природном источнике" включает случай, когда нуклеиновая кислота присутствует в источнике

природной клетки, но находится в другом хромосомном положении или граничит с последовательностями нуклеиновых кислот, обычно не присутствующими в клетке источника. Примером нуклеиновой кислоты изолированного лиганда trpI служит ДНК или РНК, кодирующая биологически активный лиганд trpI, имеющая как минимум 75% идентичности последовательности, предпочтительно минимум 80%, более предпочтительно минимум 85%, еще более предпочтительно минимум 90% и наиболее предпочтительно минимум 95% идентичности последовательности с человеческим, мышинным или свиным лигандом trpI.

"Контрольные последовательности" означают последовательности ДНК, необходимые для экспрессии оперативно связанной кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина. Контрольные последовательности, подходящие для прокариотических, например, включают промотор, возможно, последовательность-оператор, участок связывания рибосом, и, возможно, другие, еще плохо исследованные, последовательности. Эукариотические клетки, как выяснено, используют промоторы, сигналы полиаденилирования и ген-усилители.

"Оперативно связанные" в применении к нуклеиновым кислотам означает, что нуклеиновые кислоты находятся в функциональных взаимоотношениях с другими последовательностями нуклеиновых кислот. Например, ДНК, отвечающая за препоследовательность или секреторный лидер, оперативно связана с ДНК, отвечающей за полипептид, если она выражена как препротейн, участвующий в секреции полипептида; ген-усилитель или промотор оперативно связан с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию последовательности; участок связывания в рибосоме оперативно связан с кодирующей последовательностью, если она расположена так, чтобы облегчать трансляцию. В целом, "оперативно связанные" означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторного лидера, смежными и находящимися в фазе считывания. Однако гены-усилители не должны быть смежными. Связывание выполняется путем лигирования в удобных ограничительных участках. Если таких участков не существует, используются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или связывающие вещества, в соответствии с обычной практикой.

"Экзогенный" в применении к элементам означает последовательность нуклеиновых кислот, являющуюся чужеродной в данной клетке, или гомологичную для клетки, но находящуюся в таком положении внутри нуклеиновой кислоты хозяйской клетки, в котором обычно этот элемент не присутствует.

"Клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются здесь поочередно, и такие определения включают все потомство клетки или клеточной линии. Так, например, термины "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную клетку объекта и культуры, произведенные от нее, независимо от количества пересадок. Понятно также, что все потомство может не быть полностью идентично по содержанию ДНК из-за случайных мутаций. Мутантное потомство, имеющее ту же функцию или биологическую активность, что и первоначальная клетка, также включается. Различия вышеуказанных обозначений будут видны по контексту.

"Плазмиды" - автономно воспроизводимые молекулы кольцевых ДНК, имеющие независимое происхождение и обозначенные здесь прописной буквой "р", перед или после которой стоят заглавные буквы или цифры. Стартовые плазмиды здесь представляют собой или промышленно используемые, обычно доступные без ограничений, или могут быть построены из таких доступных плазмидов в соответствии с известными способами. Кроме того, другие эквивалентные плазмиды описаны в литературе и известны любому специалисту.

"Ограниченное энзимное расщепление" в применении к ДНК означает каталитическое разложение внутренних фосфодиэфирных связей ДНК энзимами, которые действуют только в определенных участках последовательности ДНК. Такие энзимы называются "ограниченными эндонуклеазами". Каждая ограниченная эндонуклеаза распознает определенную последовательность ДНК, называемую "участком ограничения" и обладающую двухскладчатой симметрией. Здесь используются коммерчески доступные ограниченные энзимы, с соблюдением их реакционных условий, коэнзимов и других требований, устанавливаемых производителями энзимов.

Все ограниченные энзимы обозначаются аббревиатурами, состоящими из заглавной буквы, за которой следуют другие буквы, представляющие микроорганизм, из которого был получен данный энзим, и затем - цифра, обозначающая конкретный энзим. В общем случае, используется около 1мкл плазида или фрагмента ДНК с 1-2 единицами энзима в примерно 20мкл буферного раствора. Соответствующие буферы и количества субстрата для конкретного ограниченного энзима определяются производителем. Обычно используется инкубация в течение около 1ч. при 37°C, но условия могут варьироваться в соответствии с инструкциями поставщика. После инкубации белок или полипептид удаляется путем экстракции фенолом или хлороформом, а расщепленная нуклеиновая кислота выделяется из водной фракции осаждением этанолом. За расщеплением ограниченными энзимами может следовать бактериально-щелочной гидролиз фосфатазой фосфатов 5'-окончаний для предохранения двух расщепленных концов фрагмента ДНК от "закольцовывания" или образования замкнутой петли, что сделает невозможной вставку другого фрагмента ДНК в участок ограничения. Если не установлено иначе, после расщепления плазмидов не производится дефосфорилирование 5'-окончаний. Методики и реагенты дефосфорилирования обычны и описаны в разделах 1.56-1.61 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

"Выделение" или "изоляция" данных фрагментов ДНК из устройств для расщепления означает отделение расщепленных ДНК на полиакриламиде или геле агарозы электрофорезом, идентификацию нужного фрагмента путем сравнения его подвижности с подвижностью контрольных фрагментов ДНК известного молекулярного веса, извлечение геле-фрагмента, содержащего нужный фрагмент и отделение геля от ДНК. Эта методика общеизвестна. Например, см. Lawn et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:6103-6114 (1981), и Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980).

"Южный анализ" или "южный блоттинг" - способ, которым наличие последовательностей ДНК в композиции после расщепления ограниченной эндонуклеазой обнаруживается путем гибридизации с

известным, меченым олигонуклеотидом или фрагментом ДНК. Южный анализ обычно включает электрофоретическое отделение расщепленных фрагментов ДНК на геле агарозы, денатурацию ДНК после электрофоретического отделения и пересадку ДНК на нитроцеллюлозу, нейлон или другую подходящую мембранную подложку для анализа меченым радиоактивными изотопами, биотинилированным или энзим-меченым зондом, как описано в разделах 9.37-9.52 Sambrook et al., выше.

"Северный анализ" или "Северный блоттинг" - способ, используемый для идентификации последовательностей РНК, которые гибридизируются с известным зондом, таким как олигонуклеотид, фрагмент ДНК, кДНК или ее фрагмент, или фрагмент РНК. Зонд метится радиоизотопом, таким как  $^{32}\text{P}$ , или биотинилированием, или энзимом. Анализируемая РНК обычно отделяется электрофорезом на агарозе или геле полиакриламида, пересаживается на нитроцеллюлозу, нейлон или другую подходящую мембранную подложку и гибридизируется с зондом с использованием стандартной технологии, хорошо известной в данной области, например, описанной в разделах 7.39-7.52 Sambrook et al., выше.

"Лигирование" - процесс образования фосфодиэфирных связей между двумя фрагментами нуклеиновой кислоты. Для лигирования двух фрагментов концы фрагментов должны быть совместимыми друг с другом. В некоторых случаях концы станут непосредственно совместимыми после расщепления эндонуклеазой. Однако может быть, необходимо сначала преобразовать, неустойчивые концы, обычно получаемые после расщепления, в прямые концы, совместимые при лигировании. Для выпрямления концов ДНК обрабатывается подходящим буфером в течение минимум 15 минут при  $15^{\circ}\text{C}$  примерно с 10 единицами фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I или T4 ДНК-полимеразы в присутствии четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Затем ДНК очищается феноло-хлороформной экстракцией и этанольным осаждением. Фрагменты ДНК, которые должны быть сшиты вместе, помещаются в раствор в примерно эквимольных количествах. Раствор также содержит АТФ, буфер лигазы и лигазу типа T4 ДНК-лигазы при содержании около 10 единиц на 0,5мкг ДНК. Если ДНК должна быть лигирована с вектором, вектор сначала линеаризуется путем расщепления соответствующей ограниченной эндонуклеазой(ами). Линеаризованный фрагмент затем обрабатывается бактериально-щелочной фосфатазой или телячьей кишечной фосфатазой для предотвращения самолигирования во время этапа лигирования.

"Приготовление" ДНК из клеток означает изоляцию ДНК плазмиды из культуры хозяйских клеток. Обычно используемые способы приготовления ДНК - крупно- и мелкомасштабное плазмидное приготовление, описанное в разделах 1.25-1.33 Sambrook et al., выше.

"Олигонуклеотиды" - короткие, состоящие из одной или двух цепей полидезоксинуклеотиды, химически синтезированные известными способами [такими как фосфотриэфирная, фосфитная или фосфорамидитная химия, использующая твердофазную технологию, как описано в EP 266,032 публ. 4 мая 1988, или через дезоксинуклеозид-Н-фосфатные промежуточные продукты, как описано у Froehler et al., Nucl. Acids Res., 14:5399-5407 (1986)]. Другие способы включают реакцию цепи полимеразы, определенную ниже, и другие автоиницирующие способы и синтезы олигонуклеотидов на твердых подложках. Все эти способы описаны в Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734 (1989). Эти способы используются в том случае, если вся последовательность нуклеиновой кислоты гена известна или комплементарность последовательности нуклеиновой кислоты с кодирующей цепью возможна. Альтернативный способ: если целевая аминокислотная последовательность известна, можно теоретически предположить потенциальные последовательности нуклеиновых кислот, используя известные и предпочтительные кодирующие остатки для каждого аминокислотного остатка. Затем олигонуклеотиды очищаются на полиакриламидных гелях.

"Реакция цепи полимеразы" или "PCR" относится к процессу или технологии, в которой малые количества, определенного участка нуклеиновой кислоты, РНК и/или ДНК, умножаются, как описано в U.S. Patent No.4,683,195, публ. 28 июля 1987. В общем случае, должна иметься информация о последовательности от концов нужного участка или за его пределами, такая, чтобы могли быть построены инициаторы олигонуклеотидов; последовательности этих инициаторов будут идентичными или подобными противоположным цепям матрицы, которая должна быть умножена. 5'-конечные нуклеотиды двух инициаторов могут соответствовать концам распространяемого материала. PCR можно использовать для распространения специфических последовательностей РНК, специфических последовательностей ДНК из общей геномной ДНК, и кДНК, транскрибированной из общей клеточной РНК, "бактериофаговых или плазмидных последовательностей, и т.д. См. Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, [Stockton Press, NY, 1989]. Здесь PCR рассматривается как один, но не единственный пример метода реакции нуклеиновой кислоты полимеразы для умножения нуклеиновой кислоты в испытательном образце, включающий использование известной нуклеиновой кислоты в качестве инициатора и нуклеиновой кислоты полимеразы для умножения или генерирования специфического участка нуклеиновой кислоты.

"Строгие условия" - такие, которые (1) предусматривают низкую стойкость ионов и высокую температуру промывки, например 0,015M NaCl/0,015M цитрата натрия/0,1% NaDodSO<sub>4</sub> (SDS) при  $50^{\circ}\text{C}$ , или (2) предусматривают во время гибридизации денатурирующий агент, такой как формамид, например, 50% (об.об.) формамида с 0,1% альбумина бычьей сыворотки/0,1% Ficoll/0,1% поливинилпирролидона/50мМ натриево-фосфатного буфера при pH6,5 с 750мМ цитрата натрия при  $42^{\circ}\text{C}$ . Другой пример - использование 50% формамида, 5×SSC (0,75M NaCl, 0,075M цитрата натрия), 50мМ фосфата натрия (pH6,8), 0,1% пирогосфата натрия, 5× раствора Denhardt, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (50мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфата декстрана при  $42^{\circ}\text{C}$ , с промывкой при  $42^{\circ}\text{C}$  в 0,2×SSC и 0,1% SDS.

"Умеренно строгие условия" описаны в Sambrook et al., выше, и включают использование промывочного раствора и условий гибридизации (температура, стойкость ионов и % SDS), менее строгих, чем описаны выше. Пример умеренно строгих условий - инкубация в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  в растворе, включающем: 20% формамида, 5×SSC (150мМ NaCl, 15мМ тринатрийцитрата), 50мМ фосфата натрия (pH 7,6), 5× раствора Denhardt, 10% сульфата декстрана и 20% денатурированной разрезанной ДНК спермы лосося с

последующей промывкой фильтров в  $1 \times \text{SSC}$  при  $37-50^\circ\text{C}$ . Опытный специалист поймет, как отрегулировать температуру, стойкость ионов и т.д. для приведения в соответствие таких факторов, как длина зонда и т.п.

"Антитела" (Abs) и "иммуноглобулины" (Igs) - гликопротеины, имеющие одинаковые структурные характеристики. В то время как антитела проявляют способность связываться с конкретными антигенами, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы с недостаточной специфичностью по отношению к антигенам. Полипептиды последнего вида, например, продуцируются на низких уровнях лимфатической системой, а на высоких уровнях - миеломами.

"Природные антитела и иммуноглобулины" - обычно гетеротетрамерические гликопротеины величиной примерно 150 000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как число дисульфидных связей между тяжелыми цепями варьируется от изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь через одинаковые промежутки включает внутрицепные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен ( $V_H$ ), за которым следует ряд постоянных доменов. Каждая легкая цепь имеет на одном конце переменный домен ( $V_L$ ) и на другом конце постоянный домен; постоянный домен легкой цепи совмещается с первым постоянным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи совмещается с переменным доменом тяжелой цепи. В частности, считается, что взаимосвязь между переменными доменами тяжелой и легкой цепей обеспечивают аминокислотные остатки [Clothia et al., J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-4596 (1985)].

Термин "переменный" относится к тому факту, что определенные участки переменных доменов значительно различаются в последовательности для различных антител и участвуют в связывании и активности каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном. Однако переменность неравномерно распределена по всему переменному домену. Она концентрируется в трех сегментах, называемых участками, определяющими комплементарность (CDR), или в сверхпеременных участках доменов как легких, так и тяжелых цепей. Более высококонсервированные участки переменных доменов называются рамками (FR). Переменные домены природных тяжелых и легких цепей, каждый из которых состоит из четырех участков FR, в основном принимают с-пластинчатую конфигурацию, соединяются тремя CDR, которые образуют петли, соединяясь с с-структурой, а в некоторых случаях образуя ее часть. CDR в каждой цепи находятся в непосредственной близости друг к другу посредством участков FR, и, вместе с CDR другой цепи участвуют в образовании в антителе участка связывания с антигеном [см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)]. Постоянные домены не участвуют непосредственно в связывании с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие в клеточной токсичности антитела или антитело-обусловленной клеточной токсичности.

Папаиновое расщепление антител продуцирует два идентичных антиген-связывающих фрагмента, называемых фрагментами "Fab", каждый из которых имеет один участок для связывания с антигеном, и остаточный фрагмент "Fc", название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработкой пепсином получают фрагмент  $F(ab)_2$ , который имеет два участка связывания с антигеном и все еще способен к перекрестной связи с антигеном.

"Fv" - минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания и связывания антигена. Этот участок состоит из димера одной тяжелой и переменного домена одной легкой цепи в жесткой, нековалентной, связи. Именно в этой конфигурации взаимодействуют три CDR каждого переменного домена, образуя участок связывания антигена на поверхности димера  $V_H-V_L$ . Шесть CDR вместе обуславливают свойство антитела связываться со специфическим антигеном. Однако, даже один переменный домен (или половина Fv, включающая только три CDR, специфических для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низким сродством, чем целый связывающий участок.

Фрагмент Fab также содержит постоянный домен легкой цепи и первый постоянный домен (CH1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab дополнением нескольких остатков у карбоксильного окончания CH1-домена тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирного участка антитела. Fab'-SH - здесь обозначение для Fab', в котором остаток (остатки) цистеина в постоянных доменах содержат свободные тиоловые группы.

Фрагменты антитела  $F(ab)_2$  первоначально продуцировались как пары фрагментов Fab', соединяющиеся шарнирными цистеинами. Другие химические пары фрагментов антител также известны.

Термин "легкая цепь" антител (иммуноглобулинов) любого позвоночного, может быть отнесен к одному из двух ярко выраженных типов, называемых каппа и лямбда и основанных на аминокислотных последовательностях их постоянных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности постоянных доменов их тяжелых цепей, иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них далее разделяются на подклассы (изотипы): IgG-1, IgG-2, IgG-3 и IgG-4; IgA-1 и IgA-2. Постоянные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры подэлементов и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Термин "антитело", используемый в широчайшем смысле, конкретно обозначает отдельные моноклональные антитела (включая антитела-агонисты и антагонисты), композиции антител с полиэпитопической спецификой, а также фрагменты антител (например, Fab,  $F(ab)_2$  и Fv), до тех пор, пока они проявляют желаемую биологическую активность.

Термин "моноклональное антитело" здесь относится к антителу, полученному из популяции в основном гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, происходящих в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против отдельных участков антигенов. Далее, в отличие от препаратов

обычных (поликлональных) антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они синтезируются культурой гибридомы, не загрязненной другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" показывает ту особенность антитела, что оно получено из, в основном, гомогенной популяции антител, и не означает, что это антитело получено каким-либо особым способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены способом гибридомы, впервые описанным Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975), или способами рекомбинации ДНК [см., например, U.S. Patent No.4,816,567 (Cabilly et al.)].

Моноклональные антитела здесь особо включают "химерические" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична с соответствующими последовательностями в антителах, полученных от определенных видов животных или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична с соответствующими последовательностями в антителах, полученных от других видов животных или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также во фрагментах этих антител, пока они проявляют желаемую биологическую активность [U.S. Patent No.4,816,567 (Cabilly et al.); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)].

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерические иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антиген-связывающие последовательности антител), содержащие минимальные последовательности, полученные от нечеловеческого иммуноглобулина. В большей степени гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (антитело реципиента), в которых остатки из участков, определяющих комплементарность (CDR), реципиента заменяются остатками из CDR нечеловеческого вида (антитело донора), такого как мышь, крыса или кролик, имеющего желаемую специфичность, сродство и возможности. В некоторых случаях остатки рамки Fv человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими нечеловеческими остатками. Далее, гуманизированное антитело может включать остатки, которые не обнаружены ни в антителе реципиента, ни в импортируемом CDR или последовательностях рамки. Эти модификации сделаны для улучшения и оптимизации характеристик антитела. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически все из как минимум, одного, обычно двух, переменных доменов, в которых все или, практически все участки CDR соответствуют участкам CDR нечеловеческого иммуноглобулина и все или практически все участки FR соответствуют последовательностям участков FR человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально будет также содержать как минимум часть постоянного участка иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина. Более детально [см. Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

"Неиммуногенный в человеке" означает, что при контакте полипептида в фармацевтически приемлемом носителе и в терапевтически эффективном количестве с соответствующей тканью человека никакой чувствительности или сопротивления полипептиду после второго введения полипептида и после соответствующего латентного периода (т.е. от 8 до 14 дней) не было проявлено.

## II. Предпочтительные варианты осуществления изобретения

Предпочтительными полипептидами данного изобретения являются в основном гомогенные полипептид(ы), называемые здесь лиганд(ы) tprl или тромбопоэтин (TPO), которые обладают свойством связываться с tprl, членом сверхсемейства цитокиновых рецепторов и имеют биологическое свойство стимуляции инкорпорации меченых нуклеотидов (<sup>3</sup>H-тимидина) в ДНК IL-3-зависимых клеток Ba/F3, подвергнутых трансфекции человеческим tprl Р. Более предпочтительно, чтобы лиганд(ы) tprl представляли собой изолированный белок (белки), обладающий гематопозитической, особенно мегакариопоэтической или тромбопоэтической активностью, а именно, способностью стимулировать размножение, развитие и/или видоизменение незрелых мегакариоцитов или их предшественников в зрелую тромбоцито-продуцирующую форму. Наиболее предпочтительно, чтобы полипептиды данного изобретения представляли собой человеческие лиганд(ы) tprl, включая их фрагменты, обладающие гематопозитической, мегакариопоэтической или тромбопоэтической активностью. Возможно, эти человеческие лиганд(ы) tprl отличаются недостаточным гликозилированием. Другие предпочтительные человеческие лиганды tprl представляют собой "ЕРО-домены" hML, называемые здесь hML<sub>153</sub> или hTPO<sub>153</sub>, усеченную форму hML, называемую hML<sub>245</sub> или hTPO<sub>245</sub> и зрелый полипептид полной длины, имеющий аминокислотную последовательность, показанную на Фиг.1 (номер последовательности: 1), называемый hML, hML<sub>332</sub> или hTPO<sub>332</sub> и биологически активный замещенный вариант hML (R153A, R154A).

Возможно, предпочтительными полипептидами данного изобретения являются биологически или иммунологически активные варианты лигандов tprl, выбранные из hML2, hML3, hML4, mML, mML2, mML3, pML и pML2.

Возможно, предпочтительными полипептидами данного изобретения являются биологически активные варианты лигандов tprl, имеющие аминокислотные последовательности, которые как минимум на 70% идентичны человеческому лиганду tprl [см. Фиг.1 (номер последовательности: 1)], лиганду tprl мыши [см. Фиг.16 (номер последовательности: 12 и 13)], рекомбинантному свиному лиганду tprl [см. Фиг.19 (номер последовательности: 18)] или свиному лиганду tprl, изолированному из апластической свинной плазмы, предпочтительно минимум на 75%, более предпочтительно минимум на 80%, еще более предпочтительно минимум на 90% и наиболее предпочтительно минимум на 95%.

Лиганды tprl, изолированные из апластической свинной плазмы, имеют следующие характеристики:

(1) Частично очищенный лиганд элюируется из гель-фильтрационной колонки с PBS, PBS, содержащим 0,1% SDS или с PBS, содержащим 4M MgCl<sub>2</sub> с Mr 60,000-70,000;

(2) Активность лиганда уничтожается проназой;

(3) Лиганд стабилен к низкой pH (2,5), к SDS до 0,1% и мочеvine 2M;  
(4) Лиганд представляет собой гликопротеин, основанный на его связывании с различными лектиновыми колонками;

(5) Высокоочищенный лиганд элюируется из невосстановленного SDS-PAGE с Mr 25,000-35,000. Меньшие количества активности также элюируются с Mr 18,000-22,000 и 60,000;

(6) Высоко очищенный лиганд растворяется в восстановленном SDS-PAGE в виде пар с Mr 28,000 и 31,000;

(7) Аmino-конечные последовательности полос 18,000-22,000, 28,000 и 31,000 - одно и то же: SPAPPACDPRLNKLRRDDHVLHGR (номер последовательности: 29); и

(8) Лиганды связываются и элюируются из следующих колонок средства:

Blue-Sepharose,  
CM Blue-Sepharose,  
MONO-Q,  
MONO-S,  
Lentil lectin-Sepharose,  
WGA-Sepharose,  
Con A-Sepharose,  
Ether 650m Toyopearl,  
Butyl 650m Toyopearl,  
Phenyl 650m Toyopearl, и  
Phenyl-Sepharose.

Более предпочтительными полипептидами лигандов mрl являются такие, которые кодируются человеческими геномными или кДНК, имеющими аминокислотную последовательность, описанную на Фиг.1 (номер последовательности: 1).

Другие предпочтительные природные биологически активные полипептиды лигандов mрl данного изобретения включают лиганд препро-mрl, про-mрl, зрелый лиганд mрl, фрагменты лиганда mрl и их гликозилированные варианты.

Другие предпочтительные полипептиды данного изобретения включают варианты и химеры последовательностей лигандов mрl. Обычно предпочтительные варианты и химеры последовательностей лигандов mрl - биологически активные варианты лигандов mрl, имеющие аминокислотные последовательности, которые как минимум на 70% идентичны человеческому лиганду mрl или свиному лиганду mрl, изолированному из апластической свиной плазмы, предпочтительно минимум на 75%, более предпочтительно минимум на 80%, еще более предпочтительно минимум на 90% и наиболее предпочтительно минимум на 95%. Примером предпочтительного варианта лиганда mрl является N-конечный домен варианта hML (называемый "ЕРО-дамен", так как его последовательность гомологична эритропоэтину). Предпочтительный ЕРО-домен hML включает около 153 первых аминокислотных остатков зрелого hML и называется hML<sub>153</sub>. Возможный предпочтительный вариант последовательности hML такой, в котором один или более основных или диосновных аминокислотных остатков в С-конечном домене замещены неосновным аминокислотным остатком (остатками) (гидрофобным, нейтральным, кислотным, ароматическим, Gly, Pro и т.д.). Предпочтительный вариант последовательности С-конечного домена hML - такой, в котором Arg-остатки 153 и 154 замещены остатками Ala. Альтернативный предпочтительный вариант последовательности hML содержит hML<sub>153</sub> или hML<sub>332</sub>, в котором аминокислоты 111-114 (QLPP или LPPQ) удалены или замещены различными тетрапептидными последовательностями (AGAG и т.п.). Вышеуказанные мутанты с делециями называются Δ4hML<sub>332</sub> или Δ4hML<sub>153</sub>.

Предпочтительная химера - слияние между лигандом mрl или его фрагментом (определенным ниже) с гетерологическим полипептидом или его фрагментом. Например, hML<sub>153</sub> может быть слит с фрагментом IgG для улучшения полупериода существования сыворотки или с IL-3, G-CSF или ЕРО для получения молекулы с выраженной тромбопоэтической или химерической гематopoэтической активностью.

Альтернативной предпочтительной химерой человеческого лиганда mрl является "химера домена ML-ЕРО", которая состоит из N-конечных остатков hML от 153 до 157, замещенных одним или более, но не всеми, остатками человеческого ЕРО, расположенного примерно так, как показано на Фиг.10 (номер последовательности: 7). В этом варианте осуществления изобретения химера hML имеет длину около 153-166 остатков, где в последовательность hML добавляются или служат заместителями отдельные остатки или их блоки из последовательности человеческого ЕРО, в положениях, соответствующих выравниванию, показанному на рис. 10 (номер последовательности: 6). Примерная блочная последовательность, вставленная в N-конечную часть hML, включает один или более участков N-гликозилирования в положениях (ЕРО) 24-27, 38-40 и 83-85; один или более из четырех предсказанных алифатических р-спиральных узлов в положениях (ЕРО) 9-22, 59-76, 90-107 и 132-152; другие высококонсервированные участки, включая N-конечные и С-конечные участки и остатки в положениях (ЕРО) 44-52 [см., например, Wen et al., Blood, 82:1507-1516 (1993) и Boissel et al., J. Biol. Chem., 268(21):15983-15993 (1993)]. Предполагается, что эта "химера доменов ML-ЕРО" будет иметь смешанную тромбопоэтическую-эритропоэтическую (ТЕРО) биологическую активность.

Другие предпочтительные полипептиды данного изобретения включают фрагменты лиганда mрl, имеющие последовательность из, как минимум, 10, 15, 20, 25, 30 или 40 аминокислотных остатков, которые идентичны последовательностям лиганда mрl, изолированного из апластической свиной плазмы или человеческого лиганда mрl, описанного здесь (см. Таблицу 14, Пример 24). Предпочтительным фрагментом лиганда mрl является человеческий ML[1-X], где X-153, 164, 191, 205, 207, 217, 229 или 245 [см. Фиг.1 (номер последовательности: 1), последовательность остатков 1-X]. Другие предпочтительные фрагменты лиганда mрl включают фрагменты, полученные в результате химического или энзиматического гидролиза или расщепления очищенного лиганда.

Другой предпочтительный объект изобретения - способ очистки молекул лиганда mrl, предусматривающий контактирование источника лиганда mrl, содержащего молекулы лиганда mrl, с иммобилизованным рецепторным полипептидом, особенно полипептидом mrl или слитого mrl, в условиях, при которых очищаемые молекулы лиганда mrl избирательно адсорбируются на иммобилизованном рецепторном полипептиде, промывку иммобилизованной подложки для удаления неадсорбированного материала и элюирование очищаемых молекул из иммобилизованного рецепторного полипептида элюирующим буфером. Источником, содержащим лиганд mrl, может быть плазма, в которой иммобилизованным рецептором предпочтительно является слияние mrl-IgG.

Альтернативным источником, содержащим лиганд mrl, является рекомбинантная клеточная культура, в которой концентрация лиганда mrl в среде культуры или в клеточных лизатах в основном выше, чем в плазме или в других природных источниках. В этом случае описанный выше метод иммуносродства, хотя и пригоден, но обычно не используется, так как можно применить более традиционные способы очистки белков, известные в данной области. В кратком изложении, предпочтительный способ очистки для получения в основном гомогенного лиганда mrl включает: удаление посторонних частиц, а также хозяйских клеток или лизированных фрагментов, например, центрифугированием или ультрафильтрацией; возможно концентрирование белка при помощи коммерчески доступного концентрационного фильтра; отделение лиганда от других примесей в один или несколько этапов, выбранных из способов иммуносродства, ионообмена (например, DEAE или матрицы, содержащие карбоксиметильные или сульфопропильные группы), Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, Lentil lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl, Phenyl Toyopearl, протеиновый A-Sepharose, SDS-Page, обращенно-фазовая HPLC (силикагель с дополнительными алифатическими группами) или хроматография на молекулярных ситах Sephadex, и затем осаждение этанолом или сульфатом аммония. Ингибитор протеазы, такой как метилсульфонилфторид (PMSF), может быть включен в любой из вышеописанных этапов для ингибирования протеолиза.

В другом предпочтительном варианте изобретение предлагает изолированное антитело, способное связываться с лигандом mrl. Предпочтительное антитело лиганда mrl [является моноклональным Kohler & Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); Campbell, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon et al., Eds, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); Huse et al., Science, 246:1275-1281 (1989)]. Предпочтительным антителом лиганда mrl является такое, которое связывается с лигандом mrl со сродством как минимум около  $10^6$  л/моль. Более предпочтительным является антитело, которое связывается со сродством как минимум около  $10^7$  л/моль. Наиболее предпочтительно, чтобы антитело, действующее против лиганда mrl, имело одну из вышеописанных эффекторных функций. Изолированным антителом, способным связываться с лигандом mrl, как вариант, может быть слито со вторым полипептидом, и полученное таким слиянием антитело может быть использовано для изолирования и очистки лиганда mrl из источника, как описано выше, для иммобилизованного полипептида mrl. В следующем предпочтительном аспекте этого варианта осуществления изобретение предлагает способ для обнаружения лиганда mrl вне организма или в организме, включающий контактирование антитела с образцом, в частности, образцом сыворотки, подозреваемой в содержании лиганда, и обнаружении, если связывание происходит.

В следующем предпочтительном варианте изобретение предлагает меченую или не меченую молекулу изолированной нуклеиновой кислоты, кодирующей лиганд mrl или его фрагменты, и молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность, комплементарную или гибридизирующую в строгих или умеренно строгих условиях молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность, кодирующую лиганд mrl. Предпочтительной нуклеиновой кислотой лиганда mrl является РНК или ДНК, кодирующая биологически активный лиганд mrl и имеющая как минимум 75%, более предпочтительно минимум 80%, еще более предпочтительно минимум 90% и наиболее предпочтительно минимум 95% идентичности с последовательностью человеческого лиганда mrl. Более предпочтительными молекулами изолированных нуклеиновых кислот являются последовательности ДНК, кодирующие биологически активный лиганд mrl, выбранные из (а) ДНК, основанной на кодирующем участке гена лиганда mrl млекопитающего (например, ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную на Фиг.1 (номер последовательности: 2), или ее фрагменты); (b) ДНК, способная гибридизировать ДНК (а) в как минимум умеренно строгих условиях; (с) ДНК, являющаяся результатом вырождения ДНК (а) или (b) вследствие вырождения генетического кода. Предполагается, что новые лиганды mrl, описанные здесь, могут быть членами семейства лигандов или цитокинов, имеющих такую идентичность последовательности, чтобы их ДНК могла гибридизироваться с ДНК, представленной на Фиг.1 (номер последовательности: 2) (или ее компонентом или фрагментами) в слабо и умеренно строгих условиях. Таким образом, следующий аспект данного изобретения включает ДНК, которая гибридируется в нестрогих и умеренно строгих условиях с ДНК, кодирующей полипептиды лигандов mrl.

В следующем предпочтительном варианте осуществления данного изобретения молекулой нуклеиновой кислоты является кДНК, кодирующая лиганд mrl и, кроме того, содержащая воспроизводимый вектор, в котором кДНК оперативно связана с контрольными последовательностями, расставляемыми хозяином, трансформированным вектором. Этот аспект включает клетки хозяина, трансформируемые вектором, и способ использования кДНК для влияния на продуцирование лиганда mrl, предусматривающий экспрессию кДНК, кодирующей лиганд mrl, в культуре трансформированных клеток хозяина и извлечение лиганда mrl из культуры клеток хозяина. Лигандом mrl, приготовленным таким образом, предпочтительно является в основном гомогенный человеческий лиганд mrl. Предпочтительной хозяйской клеткой для продуцирования лиганда mrl является клетка яичника китайского хомяка (СНО).

Далее изобретение включает предпочтительный способ лечения млекопитающих, страдающих иммунологическими или гематопозитическими расстройствами, в частности, тромбоцитопенией, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества лиганда mrl. Возможно применение лиганда mrl в сочетании с цитокином, в частности, колониестимулирующим агентом или интерлейкином.

Предпочтительными колониестимулирующими, агентами или интерлейкинами являются: кит-лиганд, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 или IL-11.

### III. Способы осуществления

Долгое время некоторыми авторами предполагалось, что продуцирование тромбоцитов регулируется многовидовыми специфическими гуморальными агентами. Было постулировано, что две различных цитокиновых активности, называемые мегакариоцито-колониестимулирующий агент (meg-CSF) и тромбопоэтин, регулируют мегакариоцитопозз и тромбопоэз [Williams et al., J. Cell Physiol., 110:101-104 (1982); Williams et al., Blood Cells, 15:123-133 (1989); and Gordon et al., Blood, 80:302-307 (1992)]. Согласно этой гипотезе, meg-CSF стимулирует размножение предшественников мегакариоцитов, в то время как тромбопоэтин сначала влияет на созревание более дифференцированных клеток, а, в конечном счете, высвобождает тромбоциты. Начиная с 60-х годов, возникновение и признаки активности meg-CSF и тромбопоэтина в плазме, сыворотке и моче животных и людей, изученные на случаях тромбоцитопении, были хорошо описаны [Odell et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108:428-431 (1961); Nakeff et al., Acta Haematol., 54:340-344 (1975); Specter, Proc. Soc. Exp. Biol., 108:146-25 149 (1961); Schreiner et al., J. Clin. Invest., 49:1709-1713 (1970); Ebbe, Blood, 44:605-608 (1974); Hoffman et al., N. Engl. J. Med., 305:533 (1981); Straneva et al., Exp. Hematol., 17:1122-1127 (1988); Mazur et al., Exp. Hematol., 13:1164 (1985); Mazur et al., J. Clin. Invest., 68:733-741 (1981); Sheiner et al., Blood, 56:183-188 (1980); Hill et al., Exp. Hematol., 20:354-360 (1992); and Kegyí et al., Int. J. Cell Cloning, 8:236-244 (1990)]. Эти активности были описаны как видо-специфические и отличные от известных цитокинов [Hill R.J. et al., Blood 80:346 (1992); Erickson-Miller C.L. et al., Brit. D. Haematol., 84:197-203 (1993); Straneva J.E. et al., Exp. Hematol. 20:4750 (1992); and Tsukada J. et al., Blood 81:866-867 (1993)]. Поэтому, попытки выделить meg-CSF или тромбопоэтин из тромбоцитопенической плазмы или мочи были безуспешными.

В соответствии с вышеупомянутыми исследованиями, описывающими тромбоцитопеническую плазму, мы обнаружили, что апластическая свиная плазма (APP), полученная от облученных свиней, стимулирует человеческий мегакариоцитопозз вне организма. Мы обнаружили, что эта стимуляторная активность аннулируется растворимым внеклеточным доменом с-mpl, подтверждая, что APP является потенциальным источником предполагаемого лиганда mpl (ML). Тогда мы успешно выделили лиганд mpl из APP, и информация последовательности аминокислот была использована для изоляции кДНК мышинового, свиного и человеческого ML. Эти ML имели последовательности, гомологичные эритропоэтину и обладали meg-CSF и тромбопоэтиноподобной активностями.

#### 1. Выделение и идентификация лиганда mpl из плазмы

Как показано выше, апластическая плазма из различных видов животных обладает активностью стимуляции гематопозза вне организма, однако ни одного гематопозического стимуляторного агента, изолированного из плазмы, прежде описано не было. Один источник получения апластической плазмы - от облученных свиней. Эта апластическая свиная плазма (APP) стимулирует человеческий гематопозз вне организма. Чтобы определить, содержит ли APP лиганд mpl, ее эффект был исследован измерением инкорпорации Н-тимидина в клетки Ba/F3, подвергнутые трансфекции. человеческим mpl P (Ba/F3-mpl), при помощи процедуры, показанной на Фиг.2. APP стимулирует инкорпорацию <sup>3</sup>H-тимидина в клетки (Ba/F3-mpl), но не в контрольные клетки Ba/F3 (т.е., не зараженные человеческим mpl P). Кроме того, в нормальной свиной плазме подобной активности не наблюдалось. Эти результаты показывают, что APP содержит агент или агенты, которые передают пролиферативный сигнал через рецептор mpl и поэтому могут быть природными лигандами для этого рецептора. Это предположение подтвердилось, когда было обнаружено, что лечение APP растворимым mpl-IgG прекращает стимуляторное действие APP на клетки (Ba/F3-mpl).

Активный агент APP представляется белком, поскольку проназа, DTT или нагрев уничтожают активность APP (Фиг.3). Этот агент также не подвергался диализу. Однако, активность была стабильна до низких pH (pH2,5 в течение 2ч.) и показывала способность связываться и элюироваться из нескольких колонок лектин-сродства, доказывая, что это гликопротеин. Дальнейшее изучение структуры и идентификация этой активности проводилось путем ее выделения из APP с использованием химеры mpl-IgG.

APP обрабатывали в соответствии с порядком, описанным в Примерах 1 и 2. В кратком изложении, лиганд mpl выделяли с использованием гидрофобной интерактивной хроматографии (HIC), иммобилизовали с использованием окрашивающей хроматографии и хроматографии по mpl-сродству. Выделение активного агента на каждом этапе показано на рис. 4, а выделение складок - в таблице 1. Общее количество активного агента, выделенного через колонку mpl-сродства, составило около 10%. Фракция пиковой активности (F6) из колонки mpl-сродства имеет расчетную величину  $9,8 \times 10^6$  единиц/мг. Общее выделение из 5 литров APP составило около  $4 \times 10^6$  складок ( $0,8$  единиц/мг к  $3,3 \times 10^6$  единиц/мг) с восстановлением  $83 \times 10^6$  складок в белок (250г на 3мкг). Мы оценили специфическую активность лиганда, элюированного из колонки mpl-сродства, в  $3 \times 10^6$  ед./мг.

Таблица 1

Выделение лиганда mpl

Образец	Объем мл	Белок мг/мл	Ед/мл	Единиц	Специфическая активность, ед/мг	Выход %	Выделение
APP	5000	50	40	200 000	0.8	-	1
Фенил	4700	0.8	40	200 000	50	94	62
Blue-Sep.	640	0.93	400	256 000	430	128	538
mpl (mid) (Fxn 5-7)	12	$5 \times 10^{-4}$	1666	20 000	3 300 000	10	4 100 000



Белок определяли анализом Bradford. Концентрацию белка фракций 5-7 mPl-элюирования оценивали на основе интенсивности серебряного окрашивания SDS-геля. Одна единица определяется как вызывающая 50% максимального стимулирования размножения клеток Ba/F3-mPl.

Анализ фракций, элюированных из колонки mPl-сродства (SDS-PAGE, 4-20%, гель Novex) в условиях восстановителя, обнаружил присутствие нескольких белков (Фиг.5). Белки с интенсивным серебряным окрашиванием показали средние величины Mr 66000, 55000, 30000, 28000 и 18000-22000. Чтобы определить, какой из этих белков стимулирует размножение клеточной культуры Ba/F3-mPl, белки элюировали из геля, как описано в Примере 2.

Результаты опыта показали, что основная часть активного агента была элюирована из слоя геля, содержащего белки с Mr 28000-32000, меньшая активность - из слоя с 18000-22000 (Фиг.6). Единственные белки, видимые в этих участках, имели Mr 30000, 28000 и 18000-22000. Чтобы идентифицировать и получить белковую последовательность для белков, найденных в этом участке геля (т.е., полосы при 30, 28 и 18-22кДа), эти три белка подвергли электроблоттингу в PVDF и определили последовательность, как описано в Примере 3. Полученные аминоконечные последовательности приведены в таблице 2.

Таблица 2

Аминоконечные последовательности лиганда mPl					
30 kDa	1	5	10	15	20
	(S)PAPPA(C)DPRLNKLRRDD(H/S)VLH(G)RL				послед.№30
28 kDa	1	5	10	15	20
	(S)PAPPA(X)DPRLNKLRRDD(H)VL(H)GR				послед.№31
18-22 kDa	1	5	10		
	XPAPPA(X)DPRLX(N)(K)				послед.№32

Компьютерный анализ показал, что эти аминокислотные последовательности найдены впервые. Поскольку все три последовательности одинаковы, было сделано предположение, что белки 30, 28 и 18-22кДа родственные и могут являться различными формами одного вновь открытого белка. Более того, этот белок (белки) и представлялся природным лигандом mPl из-за его активности, определенной на SDS-PAGE в том же участке (28000-32000) 4-20% геля. Кроме того, при гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонки Superose 12 (Pharmacia) был получен частично очищенный лиганд с Mr 17 000-30 000. Предполагается, что различные Mr-формы лиганда являются результатом протеолиза или гликозилирования или других пост- или предтрансляционных модификаций.

Как описано ранее, РНК обратного человеческого mPl аннулирует мегакариоцитопоз в культурах человеческого костного мозга, обогащенных родительскими клетками CD 34<sup>+</sup>, не влияя на видоизменение других видов кроветворных клеток (Methla et al., выше). Этот результат приводит к предположению, что рецептор mPl может играть некоторую роль в видоизменении и размножении мегакариоцитов вне организма. Чтобы полнее изучить роль лиганда mPl в мегакариоцитопозе, сравнили влияние APP и APP, лишенной лиганда mPl, на человеческий мегакариоцитопоз вне организма. Влияние APP на человеческий мегакариоцитопоз определяли с использованием модификации анализа жидкостно-сuspензионного мегакариоцитопоза, описанной в Примере 4. При этом анализе клетки человеческого периферического ствола (PSC) обрабатывались APP до и после хроматографии по mPl-IgG-сродству. Стимуляция GPIIb/IIIa мегакариоцитопоза подсчитывали при посредстве антитела <sup>125</sup>I-anti-IIb IIIa (Фиг.7). Как показано на Фиг.7, 10% APP вызывает приблизительно 3-кратное усиление стимуляции, в то время как APP, лишенная лиганда mPl, не оказывает никакого влияния. Примечателен также тот факт, что APP, лишенная лиганда mPl, не вызывает размножения клеток Ba/F3-mPl.

В другом опыте растворимый человеческий mPl-IgG, добавляемый на 0, 2 и 4 день к культурам, содержащим 10% APP, нейтрализовал стимуляторное действие APP на человеческий мегакариоцитопоз (Фиг.8). Эти результаты показывают, что лиганд mPl играет определенную роль в регулировании человеческого мегакариоцитопоза и поэтому может быть использован при лечении тромбоцитопении.

## 2. Молекулярное клонирование лиганда mPl

На основе аминоконечной аминокислотной последовательности, полученной из белков 30, 28 и 18-22кДа (см. Таблицу 2), были построены два вырожденных олигонуклеотидных первичных фонда, используемые для усиления свиной геномной ДНК при помощи PCR. Разумно было предположить, что если аминоконечная аминокислотная последовательность кодируется отдельным экзоном, то длина точного продукта PCR должна составлять 69 оснований. Был найден фрагмент ДНК такого размера и субклонирован в pGEMT. Последовательности олигонуклеотидных инициаторов PCR и три полученных клон показаны в Примере 5. Аминокислотная последовательность (PRLNKLRR [номер последовательности: 33]) пептида, закодированного между инициаторами PCR, оказалась идентичной последовательности, полученной путем аминоконечного белкового секвенирования свиного лиганда (см. остатки 9-17 в последовательностях свиных белков 28 и 30кДа).

Синтетический олигонуклеотид, основанный на последовательности фрагмента PCR, был использован для просеивания библиотеки человеческих геномных ДНК. Был сконструирован 45-мерный олигонуклеотид, обозначенный pR45, и синтезирован на базе последовательности фрагмента, PCR. Этот олигонуклеотид имел следующую последовательность:

5'GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCG 3'

послед.№34

Этот дезоксиолигонуклеотид был использован для отбора библиотеки человеческих геномных ДНК в жестких условиях гибридизации и промывки в соответствии с Примером 6. Позитивные клоны были собраны, очищены и проанализированы методами ограниченного картирования и южного блоттинга. Фрагмент EcoRI-XbaI (390 оснований), гибридизованный с 45-мером, был субклонирован в pBluescript SK-. Последовательность ДНК этого клона подтвердила, что ДНК, кодирующая человеческий гомолог свиного лиганда mrl, изолирована. Последовательность человеческой ДНК и выведенная аминокислотная последовательность показаны на рис. 9 (номера последовательностей: 3 и 4). Предсказанные положения интронов в геномной последовательности также указаны стрелками и определяют предполагаемый экзон ("экзон 3").

На основе последовательности человеческого "экзона 3" (Пример 6) были синтезированы олигонуклеотиды, соответствующие концам 3' и 5' последовательности экзона. Эти 2 инициатора были использованы в реакциях PCR в качестве шаблона кДНК, приготовленного из различных тканей человека. Ожидаемый размер точного продукта PCR составлял 140 оснований. После анализа продуктов PCR на 12% полиакриламидном геле фрагмент ДНК ожидаемого размера был обнаружен в библиотеках кДНК, полученных из взрослой человеческой почки, клетках 293 зародышевой почки и кДНК, полученной из человеческой зародышевой печени.

Библиотека кДНК зародышевой печени ( $7 \times 10^6$  клонов) в лямбда-DR2 была, в свою очередь, просеяна при помощи того же 45-мерного олигонуклеотида, используемого для просеивания человеческой геномной библиотеки и библиотеки кДНК зародышевой печени в жестких условиях гибридизации. Позитивные клоны были собраны, очищены, и размер вставки был определен по PCR. Один клон со вставкой 1,8kb был выбран для дальнейшего анализа. Используя процедуры, описанные в Примере 7, были получены нуклеотид и выведенная аминокислотная последовательность человеческого лиганда mrl (hML). Эти последовательности представлены на Фиг.1 (номера последовательностей: 1 и 2).

### 3. Структура человеческого лиганда mrl (hML)

Человеческий лиганд mrl (hML) последовательности кДНК, Фиг.1 (номер последовательности: 2), включает 1774 нуклеотида, за которыми следует поли (A) хвост. Он содержит 215 нуклеотидов нетранслируемой последовательности 5' и 498 нуклеотидов нетранслируемой последовательности 3'. Предполагаемый иницирующий кодон в нуклеотидной позиции (216-218) находится внутри общей типичной последовательности, предпочтительной для иницирования эукариотической трансляции. Открытая рамка считывания состоит из 1059 нуклеотидов и кодирует 353 аминокислотных полипептида, начиная с позиции нуклеотида 220. N-окончание предсказанной аминокислотной последовательности высокогидрофобно и, вероятно, соответствует сигнальному пептиду. Компьютерный анализ предсказанной аминокислотной последовательности [von Heijne et al., Eur. J. Biochem., 133:17-21 (1983)] показывает потенциальный участок расщепления для сигнальной пептидазы между остатками 21 и 22. Расщепление в этой позиции будет генерировать зрелый полипептид из 332 аминокислотных остатков, начиная с amino-конечной последовательности, полученной из лиганда mrl, очищенного из свиной плазмы. Предсказанный негликозилированный молекулярный вес лиганда из 332 аминокислотных остатков - около 38кДа. Существует 6 потенциальных участков N-гликозилирования и 4 цистеиновых остатка.

Сравнение последовательности лиганда mrl с базой данных последовательностей Genbank обнаруживает 23% идентичности между amino-конечными 153 остатками зрелого человеческого лиганда mrl - и человеческим эритропоэтином, Фиг.10 (номера последовательности: 6 и 7). Если принять в расчет консервативные заместители, этот участок hML показывает 50% подобия человеческому эритропоэтину (hEPO). EPO и hML содержат 4 цистеина. Три из четырех цистеинов в hML законсервированы, включая первый и последний цистеин. Целенаправленные мутагенные эксперименты показали, что первый и последний цистеины эритропоэтина образуют дисульфидную связь, необходимую для функции [Wang, F.F. et al., Endocrinology 116:2286-2292 (1983)]. По аналогии, первый и последний цистеины hML тоже могут образовывать критическую дисульфидную связь. Ни один из участков гликозилирования в hML не законсервирован. Все потенциальные N-связанные участки гликозилирования hML расположены в карбокси-конечной половине полипептида hML.

Подобно hEPO, мРНК hML не содержит ни общей типичной полиаденилированной последовательности AAUAAA, ни регуляторного элемента AUUUA, который присутствует в нетранслируемых участках 3' многих цитокинов и, как предполагается, оказывает влияние на стабильность мРНК [Shaw et al., Cell, 46:659-667 (1986)]. Анализ северного блоттинга показал низкие уровни транскрипции РНК hML (1,8kb) как зародышевой, так и во взрослой почках. После длительной выдержки во взрослой почке могла быть найдена более слабая полоса того же размера. При сравнении, человеческий эритропоэтин выражается в зародышевой печени и, как отклик на гипоксию, во взрослой почке и печени [Jacobs et al., Nature, 313:804-809 (198); Bondurant et al., Molec. Cell. Biol., 6:2731-2733 (1986)].

Важность C-конечной части hML еще предстоит изучить. Судя по наличию шести потенциальных участков для N-гликозилирования и способности лиганда связываться с колонками лектин-сродства, эта часть hML, вероятно, гликозилирована. В некоторых опытах с гелевым элюированием мы наблюдали активность с Mr около 60 000, которая может представлять гликозилированную молекулу полной длины. Следовательно, C-конечная часть может служить для стабилизации и увеличения полупериода существования циркулирующего hML. В случае эритропоэтина негликозилированная форма обладает вне организма полной биологической активностью, но имеет значительно сниженный полупериод существования по сравнению с гликозилированным эритропоэтином [Takeuchi et al., J. Biol. Chem., 265:12127-12130 (1990); Narhi et al., J. Biol. Chem., 266:23022-23026 (1991); Spivack et al., Blood, 7:90-99 (1989)]. C-конечный домен hML содержит 2 диосновных аминокислотных последовательности (раппорт Arg-Arg в позициях 153-154 и 245-246), которые могут служить в качестве потенциальных рабочих участков. Расщепление на этих участках может отвечать за генерирование форм 30, 28 и 18-22кДа лиганда mrl, изолированного из APP. Примечательно, что последовательность Arg<sub>153</sub>-Arg<sub>154</sub> располагается сразу после эритропоэтин-подобного домена ML. Эти

наблюдения показывают, что ML полной длины может представлять собой белок-предшественник, который подвергается ограниченному протеолизу для генерирования зрелого лиганда.

#### 4. Изоформы и варианты человеческого лиганда mrl

Изоформы, или альтернативно сращенные формы человеческого лиганда mrl были обнаружены при помощи PCR в человеческой взрослой печени. В кратком изложении, инициаторы были синтезированы в соответствии с каждым концом кодовой последовательности hML, так же как были выбраны внутренние участки последовательности. Эти инициаторы использовали в RT-PCR для усиления РНК взрослой человеческой печени, как описано в Примере 10. Кроме формы полной длины, обозначенной hML, исследовали или выводили три других формы, обозначенные hML2, hML3, hML4. Зрелые выведенные аминокислотные последовательности всех четырех изоформ представлены на Фиг.11 (номера последовательностей: 6, 8, 9 и 10). hML3 имеет делецию 116 нуклеотидов в позиции 700, что приводит к аминокислотной-делеции и сдвигу рамки. Теперь кДНК кодирует зрелый полипептид длиной в 265 аминокислот, являющийся производным от последовательности hML в позиции аминокислотного остатка 139. Наконец, hML4 имеет делецию 12 нуклеотидов после нуклеотидной позиции 618 (также обнаруженную в последовательностях мыши и свиньи (см. ниже) и делецию 116 оснований, обнаруженную в hML3. Хотя ни один клон с единственной делецией 12 оснований (после нуклеотида 619) не был выделен в человеке (обозначение hML2), эта форма, вероятно, существует, поскольку такая изоформа была идентифицирована у мыши и свиньи (см. ниже), и поскольку она была идентифицирована в сочетании с делецией 116 в hML4.

Были сконструированы замещенный вариант hML, в котором диосновная последовательность Arg<sub>153</sub>Arg<sub>154</sub> заменена двумя аланиновыми остатками, и усеченная форма "ЕРО-домена" hML, чтобы определить, необходима ли полная длина ML для биологической активности. Замещенный вариант диосновной последовательности Arg<sub>153</sub>Arg<sub>154</sub>, называемый hML(R153A, R154A) был сконструирован с использованием PCR, как описано в Примере 10. Усеченная форма "ЕРО-домена", hML<sub>153</sub>, также была создана с использованием PCR при введении стопорного кодона после Arg<sub>153</sub>.

#### 5. Экспрессия рекомбинантного человеческого лиганда mrl (rhML) во временно трансфицированных клетках (293) человеческой эмбриональной почки

Чтобы убедиться, что клонированная человеческая кДНК кодирует лиганд для mrl, лиганд был экспрессирован в клетках 293 млекопитающего под контролем непосредственного цитомегаловирусного промотора ранней стадии, с использованием векторов экспрессии pRK5-hML или pRK5-hML<sub>153</sub>. Было обнаружено, что супернатанты из временно трансфицированных человеческих эмбриональных клеток 293 почки стимулируют инкорпорацию <sup>3</sup>H-тимидина в клетки Ba/F3-mrl, но не в родительские клетки Ba/F3 (Фиг.12А). Среда из клеток 293, трансфицированных одним вектором pRK, не содержала этой активности. Добавление к среде mrl-IgG аннулировало стимуляцию (данные не показаны). Эти результаты показывают, что клонированная кДНК кодирует функциональный человеческий ML (hML).

Чтобы определить, может ли "ЕРО-домен" самостоятельно связывать и активировать mrl, в клетках 293 была экспрессирована усеченная форма hML, rhML<sub>153</sub>. Было обнаружено, что супернатанты из трансфицированных клеток обладают активностью, подобной активности, присутствующей в супернатантах из клеток, выражающих hML полной длины (Фиг.12А), что показывает, что С-конечный домен ML не обязателен для связывания и активации с-mrl.

#### 6. Лиганд mrl стимулирует мегакариопоэз и тромбопоэз

Как rhML, так и усеченные формы rhML<sub>153</sub> рекомбинантного hML стимулировали человеческий мегакариопоэз вне организма (Фиг.12В). Этот эффект наблюдался в отсутствие других экзогенно добавляемых агентов гематopoэтического роста. За исключением IL-3, mrl был единственным испытанным агентом гематopoэтического роста, проявляющим такую активность. IL-11, IL-6, IL-1, эритропоэтин, G-CSF, IL-9, LIF, кит-лиганд (KL), M-CSF, OSM и GM-CSF не оказывали влияния на мегакариопоэз при отдельных испытаниях в нашем исследовании (данные не показаны). Этот результат показывает, что ML обладает мегакариостимулирующей активностью и определяет для ML роль в регулировании мегакариопоэза.

Тромбопоэтическая активность, присутствующая в плазме тромбоцитopenических животных, проявила способность стимуляции продуцирования тромбоцитов при анализе по методу мышинного образца ответных тромбоцитов [McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14:1006-1001 (1973) и McDonald et al., Scand. J. Haematol., 16:326-334 (1976)]. В этой модели мышей подвергли острой тромбоцитopenии, используя особую антитромбоцитную сыворотку, что приводит к предсказуемому ответному продуцированию тромбоцитов. Такие иммуно-тромбоцитopenические мыши более чувствительны к экзогенным тромбопоэтиноподобным активностям, чем нормальные мыши [McDonald, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 14:1006-1001 (1973)], как эсипоксические мыши более чувствительны к эритропоэтину, чем нормальные мыши [McDonald, et al., J. Lab. Clin. Med., 77:134-143 (1971)]. Чтобы определить, стимулирует ли gML продуцирование тромбоцитов в организме, мышам с ответным тромбоцитозом вводили частично очищенный rhML. Затем посчитали количество тромбоцитов и инкорпорацию <sup>35</sup>S в тромбоциты. Введение мышам 64000 или 32000 единиц gML значительно увеличило продуцирование тромбоцитов, что очевидно из 20%-го увеличения количества тромбоцитов (p=0,0005 и 0,0001 соответственно) и 40%-го увеличения инкорпорации <sup>35</sup>S в тромбоциты (p=0,003) у обработанных мышей по сравнению с контрольными мышами, которым вводили только наполнитель (Фиг.12С). Этот уровень стимуляции сравним с уровнем, наблюдаемым в этой модели при применении IL-6 (данные не показаны). Введение 16000 единиц заметно не стимулировало продуцирование тромбоцитов. Эти результаты показывают, что ML стимулирует продуцирование тромбоцитов в зависимости от дозы и поэтому обладает тромбопоэтиноподобной активностью.

Клетки 293 подвергли также трансфекции другими изоформами hML, описанными выше, и исследовали супернатанты путем анализа размножения клеток Ba/F3-mrl (Фиг.13). Показанные на рисунке hML2 и hML3 не проявили ощутимой активности при этом анализе, однако активность hML(R153A, R154A) была подобна hML и hML<sub>153</sub>, показывая, что процессы на диосновном участке Arg<sub>153</sub>-Arg<sub>154</sub> ни необходимы, ни вредны для активности.

## 7. Мегакарицитопоэз и лиганд *mpl*

Было сделано предположение, что мегакарицитопоэз регулируется на многих клеточных уровнях [Williams et al., *Blood*, 15:123-133 (1989)]. В основном это предположение базируется на наблюдении, что определенные агенты гематопозитического роста стимулируют размножение предшественников мегакарицитов, в то время как другие главным образом влияют на развитие клеток в зрелую форму. Результаты, представленные здесь, приводят к выводу, что ML действует как агент размножения, так и развития. То, что ML стимулирует размножение, доказывает несколько фактов. Во-первых, APP стимулирует и размножение, и развитие человеческих мегакарицитов вне организма, и эта стимуляция полностью ингибируется *mpl*-IgG (Фиг.7 и 8). Кроме того, ингибирование образования колонии мегакарицитов обратными олигонуклеотидами *c-mpl* [Methia et al., *Blood*, 82:1395-1401 (1993)] и открытие факта, что *c-mpl* может переносить пролиферативный сигнал в клетки, в которые он вносится [Scoda et al., *EMBO*, 12:2645-2653 (1993) и Vigon et al., *Oncogene*, 8:2607-2615 (1993)] также означает, что ML стимулирует размножение. Очевидная экспрессия *c-mpl* на всех стадиях видоизменения мегакарицитов [Methia et al., *Blood*, 82:1395-1401 (1993)] и способность рекомбинантного ML ускоренно стимулировать продуцирование тромбоцитов в организме означает, что ML также влияет и на развитие. Доступность рекомбинантного ML делает возможным тщательное изучение его роли в регулировании мегакарицитопоэза и тромбоцитопоэза, а также его потенциальной способности влиять на другие виды кроветворных клеток.

## 8. Изоляция гена человеческого лиганда *mpl* (TPO).

Клоны человеческой геномной ДНК гена TPO были изолированы путем просеивания человеческой геномной библиотеки в  $\lambda$ gem12 с pR45, в нестрогих или в строгих условиях с фрагментом, соответствующим половине 3' последовательности человеческой кДНК для лиганда *mpl*. Были изолированы два перекрывающихся  $\lambda$ -клона размером в 35kb. Два перекрывающихся фрагмента (BamH1 и EcoRI), содержащие полный ген TPO, были субклонированы и секвенированы (см. Фиг.14A, 14B и 14C).

Структура человеческого гена включает 6 экзонов в пределах 7kb геномной ДНК. Границы всех экзон/интрон-переходов содержат общий для генов млекопитающих раппорт [Shapiro, M.B., et al., *Nucl. Acids Res.* 15:7155 (1987)]. Экзон 1 и экзон 2 содержат нетранслируемую последовательность 5' и четыре начальных аминокислоты сигнального пептида. Остальная часть секреторного сигнала и первые 26 аминокислот зрелого белка кодируются в пределах экзона 3. Целый карбоксильный домен и нетранслируемая последовательность 3', а также около 50 аминокислот эритропоэтин-подобного домена кодируются в пределах экзона 6. Четыре аминокислоты, участвующие в делеции, наблюдаемой в пределах hML-2 (hTPO-2), расположены в конце 5' экзона 6.

Анализ человеческой геномной ДНК методом южного блоттинга показал, что ген для TPO присутствует в единственной копии. Хромосомное расположение гена было определено флуоресцентной гибридизацией на месте, (FISH) и отнесено к хромосоме 3q27-28.

## 9. Экспрессия и очистка TPO из клеток 293

Приготовление и очистка ML TPO из клеток 293 детально описано в Примере 19. В кратком изложении, кДНК, соответствующая целой открытой считывающей рамки TPO, была получена при помощи PCR с использованием pRK5-hml I. Продукт PCR был очищен и клонирован между участками ограничения ClaI и XbaI плазмиды pRK5tkneo (pRKS-производный вектор, модифицированный для выражения неомицин-резистентного гена в условиях активации тимидинкиназой) для получения вектора pRK5tkneo. ORF (векторная последовательность для целой открытой считывающей рамки).

Вторая векторная последовательность для гомологичного домена ERO была генерирована тем же путем, но с использованием других инициаторов PCR, для получения окончательной конструкции, называемой pRK5-tkneoERO-D.

Этими двумя конструкциями были заражены клетки человеческой эмбриональной почки методом  $\text{CaPO}_4$ , после чего отобрали неомицин-резистентные клоны и допустили их рост до слияния. С использованием анализа размножения Ba/F3-*mpl* оценили экспрессию ML<sub>153</sub> или ML<sub>154</sub> из этих клонов в кондиционированной среде.

Очистка rhML<sub>332</sub> проводилась, как описано в Примере 19. В кратком изложении, кондиционированную среду 293-rhML<sub>332</sub> ввели в колонку Blue-Sepharose (Pharmacia) и затем промывали буфером, содержащим 2M мочевины и 1M NaCl. Затем элюат из Blue-Sepharose непосредственно перенесли в колонку WGA-Sepharose, промыли 10 колоночными объемами буфера, содержащего 0,5M N-ацетил-D-глюкозамина. Элюат из WGA-Sepharose перенесли в колонку C4-HPLC (Synchrom, Inc.) и элюировали с непрерывным пропанольным градиентом. Посредством SDS-PAGE очищенный 293-rhML<sub>332</sub> мигрирует в виде широкой полосы в участок геля 68-80кДа (см. Фиг.15).

Очистка rhML<sub>153</sub> также проводилась, как в Примере 19. В кратком изложении, кондиционированную среду 293-rhML<sub>153</sub> элюировали в колонке Blue-Sepharose, как описано для rhML<sub>332</sub>. Затем элюат из Blue-Sepharose непосредственно перенесли в колонку *mpl*-сродства, как описано выше. rhML<sub>153</sub>, элюированный из колонки *mpl*-сродства, подвергли очистке до гомогенности, используя колонку C4-HPLC в тех же условиях, что и для rhML<sub>332</sub>. Посредством SDS-PAGE очищенный 293-rhML<sub>153</sub> мигрирует в две широких и две узких полосы с Mr около 18 000-22 000 (см. Фиг.15).

## 10. Лиганд *mpl* мыши

Фрагмент ДНК, соответствующий кодированному участку лиганда *mpl*, была получена при помощи PCR, очищен и помечен в присутствии  $^{32}\text{P}$ -dATP и  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Этот образец был использован для просеивания  $10^6$  клонов библиотеки кДНК печени мыши в  $\lambda$ GT10. Клон мыши, Фиг.16 (номера последовательностей: 12 и 13), содержащий 1443 вставленных пар оснований, был изолирован и секвенирован. Предполагаемый иницирующий кодон в нуклеотидной позиции 138-141 находился в пределах общей типичной последовательности, подходящей для эукариотического трансляционного инициирования [Kozak, M. J. *Cell Biol.*, 108:229-241 (1989)]. Эта последовательность определяет открытую рамку считывания 1056 нуклеотидов, которая предопределяет первичный трансляционный продукт 352 аминокислот. Края этой рамки

образуют 137 нуклеотидов нетранслируемой последовательности 5' и 247 нуклеотидов последовательности 3'. За нетранслируемым участком 3' ненаблюдается поли(А) хвоста, показывая, что клон, вероятно, неполный. N-окончание предсказанной аминокислотной последовательности высокогидрофобно и, вероятно, представляет сигнальный пептид. Компьютерный анализ [von Heijne, G. Eur. J. Biochem. 133:17-21 (1983)] показывает потенциальный участок расщепления для сигнальной пептидазы между остатками 21 и 22. Расщепление в этой позиции будет генерировать зрелый полипептид из 331 аминокислоты (35кДа), идентифицированный как mML<sub>331</sub> (или mML2 по причинам, изложенным ниже). Последовательность содержит 4 цистеина, все законсервированы в человеческой последовательности, и семь потенциальных N-гликозилированных участков, 5 из которых законсервированы в человеческой последовательности. И снова, как в случае hML, все семь потенциальных N-гликозилированных участков расположены в С-конечной половине белка.

При сравнении с человеческим ML была обнаружена значительная идентичность для нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей в "ЕРО-доменах" этих ML. Однако, при совмещении выведенных аминокислотных последовательностей человеческого и мышинного ML мышинная последовательность показала наличие тетрапептидной делеции между остатками 111-114, соответствующими 12 нуклеотидным делециям после позиции 618 в человеческой (см. выше) и свинной (см. ниже) кДНК. В соответствии с этим были исследованы дополнительные клоны для обнаружения возможных изоформ ML мыши. Один клон кодировал полипептид из 335 аминокислотных выведенных последовательностей, содержащий "отсутствующий" тетрапептид LPLQ. Эта форма предположительно является мышинным ML полной длины и названа mML или mML<sub>335</sub>. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательность для mML представлены на Фиг.17 (номера последовательностей: 14 и 15). Этот клон кДНК состоит из 1443 пар оснований и оканчивается поли(А) хвостом. Он содержит открытую рамку считывания (1068 оснований). Край этой рамки образуют 134 основания нетранслируемой последовательности 5' и 241 основание последовательности 3'. Предполагаемый иницирующий кодон находится в нуклеотидной позиции 138-140. Открытая рамка считывания кодирует предсказанный белок из 356 аминокислот, первые 21 из которых высокогидрофобны и функционируют, скорее всего, как секреторный сигнал.

Наконец, был изолирован и секвенирован третий клон мыши, содержащий делецию 116 нуклеотидов, соответствующую hML3. Поэтому данная мышинная изоформа была обозначена mML3. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей этих двух изоформ показано на Фиг.18 (номера последовательностей: 9 и 16).

Общая идентичность аминокислотных последовательностей между ML человека и мыши, Фиг.19 (номера последовательностей 6 и 17), составляет 72%, но эта гомология неравномерно распределена. Участок, определенный как "ЕРО-домен" (аминокислоты 1-153) для человеческой последовательности и 1-149 для мышинной) лучше законсервирован (86% гомологии), чем карбокси-конечный участок белка (62% гомологии). Это служит еще одним доказательством того, что только "ЕРО-домен" важен для биологической активности белка. Интересно, что из двух раппортов диосновных кислот, найденных в hML, только диосновный раппорт, следующий сразу за "ЕРО-доменом" (позиции остатков 153-154) в человеческой последовательности, присутствует в мышинной последовательности. Это согласуется с предположением, что ML- полной длины может представлять белок-предшественник, который подвергается ограниченному протеолизу, генерируя зрелый лиганд. Как альтернатива, протеолиз между Arg<sub>153</sub> и Arg<sub>154</sub> может образовать зазор hML.

Вектор экспрессии, содержащий целую кодирующую последовательность mML, временно ввели в клетки 293, как описано в Примере 1. Кондиционированная среда из этих клеток стимулировала инкорпорацию <sup>3</sup>H-тимидина в клетки Ba/F3, выражающие mrl мыши или человека, но не влияла на родительскую (не содержащую mrl) клеточную линию. Это показывает, что клонированная кДНК mrl мыши кодирует функциональный лиганд, способный активировать рецептор ML (mrl) как мыши, так и человека.

#### 11. Свинной лиганд mrl

Свиную кДНК ML (pML) изолировали при помощи RACE PCR, как описано в Примере 13. кДНК-продукт размером 1342 оснований нашли в почке и субклонировали. Несколько клонов секвенировали и обнаружили свинной лиганд mrl из 332 аминокислотных остатков, обозначив его pML (или pML<sub>332</sub>), имеющий нуклеотидную и выведенную аминокислотную последовательность, показанную на Фиг.20 (номера последовательностей: 18 и 19).

И снова была идентифицирована вторая форма, обозначенная pML2, кодирующая белок с делецией 4 аминокислот (228 аминокислотных остатков) (см. Фиг.21 (номер последовательности: 21)). Сравнение аминокислотных последовательностей pML и pML2 показывает, что последняя форма идентична, за исключением того, что тетрапептид QLPP, соответствующий остаткам 111-114, отсутствует (см. Фиг.22 (номера последовательностей: 18 и 21)). Четыре аминокислотных делеции, наблюдаемые в кДНК ML мыши и свиньи, находятся в одной и той же позиции в пределах предсказанных белков.

Сравнение предсказанных аминокислотных последовательностей зрелого ML человека, мыши и свиньи, Фиг.19 (номера последовательностей: 6, 17 и 18), показывает, что общая идентичность последовательностей составляет 72% между мышью и человеком, 68% между мышью и свиньей и 73% между свиньей и человеком. Значительно большая гомология наблюдается в аминокислотной половине ML (ЕРО-гомологичный домен). Этот домен идентичен на 80-84% между любыми двумя видами, в то время как карбокси-конечная половина (углеводородный домен) показывает лишь 57-67% идентичности. Диосновный аминокислотный раппорт, который может представлять участок протеазного расщепления, находится на карбоксильном конце эритропоэтин-гомологичного домена. Этот раппорт законсервирован во всех трех видах в этой позиции [Фиг.19 (номера последовательностей: 6, 17 и 18)]. Второй диосновный участок, имеющийся в позициях 245 и 246 в человеческой последовательности, не содержится в последовательностях мыши и свиньи. Последовательность ML мыши и свиньи содержит 4 цистеина, законсервированные в человеческой

последовательности. Имеется 7 участков N-гликозилирования в мышинном лиганде и 6 - в свином. Все потенциальные участки N-гликозилирования снова находятся в С-конечной половине белка.

## 12. Экспрессия и очистка ТРО из клеток яичника китайского хомяка (CHO)

Векторы экспрессии, используемые для трансфекции клеток CHO, обозначаются pSV15.ID.LL.MLORF (полная длина или ТРО<sub>332</sub>) и pSV15.ID.LL.MLEPO-D (усеченная форма или ТРО<sub>153</sub>). Представляющие интерес свойства этих плазмидов показаны на Фиг.23 и 24.

Процедуры трансфекции описаны в Примере 20. В кратком изложении, кДНК, соответствующую целой открытой рамке считывания ТРО, получили при помощи PCR. Продукт PCR очистили и клонировали между двумя участками ограничения (ClaI и SalI) плазмиды pSV15.ID.LL для получения вектора pSV15.ID.LL.MLORF. Вторую конструкцию, соответствующую ЕРО-гомологичному домену, генерировали тем же способом, но с использованием обратного инициатора (EPOD.Sal). Окончательная конструкция последовательности вектора для ЕРО-гомологичного домена ТРО названа pSV15.ID.LL.MLEPO-D.

Эти две конструкции линейаризовали при помощи NotI и ввели в клетки яичника китайского хомяка [клетки CHO-DP12, EP 307,247 публ. 15 марта 1989] путем электропорации. 10<sup>7</sup> клеток электропорировали в устройстве электропорации BRL (350В, 330мФ, низкая емкость) в присутствии 10, 25 и 50мг ДНК, как описано в [Andreason, G.L. J. Tissue Cult. Meth. 15,56 (1993)]. На следующий день после трансфекции произвели расщепление клеток в избирательной среде DHFR (высокогликозный DMEM-F12 50:50 без глицина, 2мМ глютамина, 2-5% диализированной зародышевой бычьей сыворотки). Через 10-15 дней отдельные колонии перенесли в 96-луночные чашки и оставили расти до слияния. Экспрессию ML<sub>153</sub> и ML<sub>332</sub> в кондиционированной среде из этих клонов оценили с использованием анализа размножения Ba/F3-mpI (описанного в Примере 1).

Процесс очистки и изоляции ТРО из собранной жидкости клеточной культуры CHO описан в Примере 20. В кратком изложении, собранную жидкость клеточной структуры (HCCF) вводят в колонку Blue-Sepharose (Pharmacia) при соотношении около 100л HCCF на литр смолы. После этого колонку промывают 3-5 колоночными объемами буфера, затем 3-5 объемами буфера, содержащего 2,0М мочевины и 1,0М NaCl.

Элюат из Blue-Sepharose, содержащий ТРО, переносят в колонку Wheat Germ Lectin Sepharose (Pharmacia), уравновешенную в элюирующем буфере Blue-Sepharose при соотношении 8-16мл элюата Blue-Sepharose на мл смолы. После этого колонку промывают 2-3 колоночными объемами балансирующего буфера. Затем ТРО элюируют 2-5 колоночными объемами буфера, содержащего 2,0М мочевины и 0,5М N-ацетил-D-глюкозамина.

Элюат Wheat Germ Lectin, содержащий ТРО, подкисляют и добавляют С<sub>12</sub>Е<sub>8</sub> к конечной концентрации 0,04%. Результирующий пул вводят в колонку обращенной фазы C4, уравновешенную в 0,1% TFA, 0,04% С<sub>12</sub>Е<sub>8</sub> при нагрузке около 0,2-0,5мг белка на мл смолы.

Белок элюируют в ацетонитриле с двухфазным линейным градиентом, содержащем 0,1% TFA и 0,04% С<sub>12</sub>Е<sub>8</sub>, и образуют пул на основе SDS-PAGE.

Затем полученный пул C4 разбавляют и диафильтруют примерно 6 объемами буфера на Amicon YM или подобной ультрафильтрационной мембране с отсечкой молекул весом 10000-30000 Дальтон. Результирующий диафильтрат можно затем непосредственно обрабатывать или далее концентрировать ультрафильтрацией. Диафильтрат/концентрат обычно регулируется до конечной концентрации 0,01% Tween-80.

Весь диафильтрат/концентрат или его часть, эквивалентную 2-5% рассчитанного объема колонки переносят в колонку Sephacryl S-300 HR (Pharmacia), уравновешенную в буфере, содержащем 0,01%, Tween-80, и хроматографируют. ТРО-содержащие фракции, очищенные от скоплений и продуктов протеолитической деградации, объединяют в пул на основе SDS-PAGE. Результирующий пул фильтруют и хранят при 2-8°C.

## 13. Способы трансформирования и иницирования синтеза ТРО в микроорганизме, а также изоляции, очистки и укладки ТРО, образованного в нем.

Конструирование векторов экспрессии E. coli ТРО детально описано в Примере 21. В кратком изложении, для выражения первых 155 аминокислот ТРО, начиная с низкомолекулярного лидера, разного для разных структур, были построены плазмиды rMP21, rMP151, rMP41, rMP57 и rMP202. Лидеры предназначены в первую очередь для высокоуровневого трансляционного иницирования и ускоренной очистки. Плазмиды rMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 сконструированы для выражения первых 153 аминокислот ТРО начиная с иницирующего метионина, и отличаются только частотой повторения кодона первых 6 аминокислот ТРО, в то время как плазмид rMP251 является производным от rMP21-1, в котором карбокс-терминированный конец ТРО увеличен на две аминокислоты. Все указанные плазмиды продуцируют высокие уровни внутриклеточной экспрессии ТРО в E. coli при иницировании триптофан-промотором [Yansura, D.G. et al. Methods in Enzymology (Goeddel, D.V., Ed.) 185:54-60, Academic Press, San Diego (1990)]. Плазмиды rMP1 и rMP172 являются промежуточными при конструировании вышеупомянутых плазмидов внутриклеточной экспрессии ТРО.

Упомянутые плазмиды внутриклеточной экспрессии ТРО использовались для трансформирования E. coli с использованием метода теплового удара CaCl<sub>2</sub> [Mandel, M. et al. J. Mol. Biol., 53:159-162, (1970)] и других процедур, описанных в Примере 21. В кратком изложении, трансформированные клетки сначала выращивали при 37°C до тех пор, пока оптическая плотность (600нм) культуры не достигла примерно 2-3. Затем культуру разбавили и, после выращивания с аэрацией, добавили кислоту. Затем культуру оставили на 15 часов для дальнейшего роста с аэрацией, после чего клетки собрали путем центрифугирования.

Процессы изоляции, очистки и конформационной укладки, приведенные ниже для получения биологически активного, соответствующим образом уложенного человеческого ТРО или его фрагментов описаны в Примерах 22 и 23 и могут быть использованы для извлечения любого варианта ТРО, включая N и С-конечные расширенные формы. Другие процессы, подходящие для укладки рекомбинантного или синтетического ТРО, см. в следующих патентах: Builder et al., U.S. Patent 4,511,502; Jones et al., U.S. Patent 4,512,922; Olson et al., U.S. Patent 4,518,526; Builder et al., U.S. Patent 4,620,948; общее описание процесса

извлечения и конформационной укладки для различных рекомбинантных белков, выраженных в нерастворимой форме в *E. coli*.

#### А. Извлечение нерастворимого ТРО

Микроорганизм, например, *E. coli*, выражающий ТРО, закодированный любым подходящим плазмидом, подвергают ферментации в условиях, в которых ТРО осаждается в виде нерастворимых "тел отражения". Как вариант, клетки сначала промываются в деструктурирующем клеточном буфере. Обычно около 100г клеток ресуспендируют в примерно 10 объемах клеточного деструктурирующего буфера (например, 10мМ Tris, 5мМ EDTA, pH8) с гомогенизатором, например, Polytron, и центрифугируют при 5000xg в течение 30 минут. Затем клетки лизируют с использованием любой обычной технологии, такой как тонизирующий удар, обработка ультразвуком, циклическим давлением, химические или ферментативные методы. Например, вышеупомянутые промываемые клеточные гранулы можно суспендировать в следующих 10 объемах клеточного деструктурирующего буфера с гомогенизатором и пропустить суспензию через устройство деструктурирования клеток LH Cell Disrupter (LH Inceltech, Inc) или через Microfluidizer (Microfluidics International) в соответствии с инструкциями производителя. Затем особое вещество, содержащее ТРО, отделяется от жидкой фазы и, возможно, промывается любой подходящей жидкостью. Например, суспензия клеточного лизата центрифугируется при 5000xg в течение 30мин., ресуспендируется и, возможно, центрифугируется второй раз для образования промытых гранул "тел отражения". Промытый гранулят может быть использован сразу или замораживается для хранения (например, при -70°C).

#### В. Солюбилизация и очистка мономерного ТРО

Нерастворимый ТРО в грануляте "тел отражения" затем солюбилизируется солюбилизирующим буфером, который содержит хаотропический агент и обычно действует при щелочной pH и содержит восстановительный агент для повышения выхода мономерного ТРО. Характерными хаотропическими агентами являются мочевины, гуанидин HCl и тиоцианат натрия. Предпочтительный хаотропический агент - гуанидин HCl. Концентрация хаотропического агента составляет обычно 4-9М, предпочтительно 6-8М. pH солюбилизирующего буфера поддерживается любым подходящим буфером в диапазоне 7,5-9,5, предпочтительно 8,0-9,0 и наиболее предпочтительно - 8,0. Предпочтительно солюбилизирующий буфер также содержит восстановительный агент, способствующий образованию мономерной формы ТРО. Подходящие восстановительные агенты включают органические соединения, содержащие свободный тиол (RSH). Характерными восстановительными агентами являются дитиотреитол (DTT), дитиозитритол (DTE), меркаптоэтанол, глутатион (GSH), цистеамин и цистеин. Предпочтительным восстановительным агентом является дитиотреитол (DTT). Как вариант, солюбилизирующий буфер может содержать мягкий окислительный агент (например, молекулярный кислород) и сульфитную соль для образования мономерного ТРО путем сульфитолитизации. В этом варианте результирующий ТРО-S-сульфонат позднее подвергается укладке в присутствии окислительно-восстановительного буфера (например, GSH/GSSG) для формирования соответствующим образом сложенного ТРО.

Белок ТРО обычно подвергается дальнейшей очистке с использованием, например, центрифугирования, гель-фильтрационной хроматографии и обращенно-фазовой колонной хроматографии.

Приведенная в качестве иллюстрации, следующая методика обеспечивает достаточный выход мономерного ТРО. Гранулят "тел отражения" ресуспендируется примерно в 5 объемах (вес.) солюбилизирующего буфера (20мМ Tris, pH8, с 6-8М гуанидина и 25мМ DTT) и перемешивается 1-3 часа, или в течение ночи, при 4°C для солюбилизации белка ТРО. При этом также полезны высокие концентрации мочевины (6-8М), но в результате это приводит к некоторому снижению выхода по сравнению с гуанидином. После солюбилизации раствор центрифугируют при 30 000xg в течение 30мин. для получения прозрачного супернатанта, содержащего денатурированный мономерный белок ТРО. Затем супернатант хроматографируют в гель-фильтрационной колонке Superdex 200 (Pharmacia, 2,6x60см) при скорости течения 2мл/мин и элюируют 20мМ фосфата натрия при pH6,0 с 10мМ DTT. Собирают фракции, содержащие мономерный денатурированный белок ТРО (элюированные между 1.60 и 200мл). Белок ТРО подвергают дальнейшей очистке в полу-подготавливаемой колонке обращенной фазы C4 (VYDAC 2x20см). При скорости 5мл/мин, образец обрабатывается в колонке, уравновешенной в 0,1% TFA (трифторуксусной кислоты) с 30% ацетонитрила. Белок элюируют с линейным градиентом ацетонитрила (30-60% за 60мин.). Очищенный восстановленный белок элюируют с примерным содержанием ацетонитрила 50%. Этот материал используется для укладки и получения биологически активного варианта ТРО.

#### С. Укладка ТРО для генерирования биологически активной формы

После солюбилизации и дальнейшей очистки ТРО получают биологически активную форму путем укладки денатурированного мономерного ТРО в окислительно-восстановительном буфере. Благодаря высокой активности ТРО (половина максимальной стимуляции в клетках Ba/F3 достигается приблизительно при 3пг/мл), возможно получение биологически активного материала при использовании многих различных буферов, детергентов и окислительно-восстановительных условий. Однако в большинстве таких сред получают лишь небольшие количества соответствующим образом сложенного материала (<10%). Для промышленного производства желателен выход не менее 10%, более предпочтителен 30-50% и наиболее предпочтителен - >50%. Была обнаружена пригодность многих различных детергентов для получения хотя бы некоторого количества правильно сложенного материала, в том числе Triton X-100, додецил-бета-мальтозид, CHAPS, CHAPSO, SDS, саркозил, Tween 20 и Tween 80, Zwittergent 3-14 и другие. Самыми предпочтительными из них оказались детергенты семейства CHAPS (CHAPS и CHAPSO), которые наилучшим образом участвовали в реакции укладки и ограничивали агрегацию белка и образование неправильных дисульфидных связей. Наиболее предпочтительными были уровни содержания CHAPS выше 1%. Для повышения выхода использовался хлорид натрия, при оптимальном содержании от 0,1М до 0,5М. Для ограничения металл-катализируемого окисления (и агрегации), которое наблюдалось в некоторых препаратах, было предпочтительно присутствие EDTA (1-5мМ) в окислительно-восстановительном буфере. Оптимальные условия укладки обеспечивали концентрации глицерина выше 15%. Для максимального выхода

было важно, чтобы окислительно-восстановительная пара в буфере состояла из окисленного и восстановленного органического тиола (RSH). Подходящие пары включают меркаптоэтанол, глутатион (GSH), цистеамин, цистеин и их соответствующие окисленные формы. Предпочтительными окислительно-восстановительными парами были глутатион (GSH):окисленный глутатион (GSSG), цистеин:цистин. Наиболее предпочтительная пара - глутатион (GSH): окисленный глутатион (GSSG). Повышенный выход наблюдался в том случае, когда молярное число окисленного члена пары было равно или превышало молярное число восстановленного члена. Значения pH между 7,5 и 9 были оптимальными для укладки этих вариантов ТРО. Органические растворители (этанол, ацетонитрил, метанол) применялись при концентрациях 10-15% или ниже. Более высокие уровни органических растворителей увеличивали количество неправильно сложенных форм. Наиболее подходящими были Tris и фосфатный буфер. Инкубация при 4°C также повышала выход правильно сложенного ТРО.

Выход сложенного материала 40-60% (от количества восстановленного и денатурированного ТРО, используемого для реакции укладки) типичен для препаратов ТРО, которые очищали на первом этапе при помощи колонки С4. Активный материал может быть получен при использовании менее чистых препаратов (т.е. сразу после колонки Superdex или после первоначальной экстракции "тел отражения"), хотя выход в этом случае меньше из-за сильного осаждения и помех, создаваемых другими (не-ТРО) белками во время процесса укладки.

Поскольку ТРО содержит 4 цистеиновых остатка, возможно генерирование трех различных дисульфидных версий этого белка:

- версия 1 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-4 и 2-3
- версия 2 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-2 и 3-4
- версия 3 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-3 и 2-4

Во время первых исследований при определении условий укладки было выделено несколько различных пиков, содержащих белок ТРО, в обращенно-фазной хроматографической колонке С4. Только один из этих пиков обладал значительной биологической активностью, определенно при помощи анализа клеток Ba/F3. В соответствии с этим условия укладки были оптимизированы в направлении увеличения выхода этой версии. В таких условиях выход неуложенных версий составлял менее 10-20% от общего количества мономерного ТРО, полученного на этапе солиubilизации.

Масс-спектрометрией и секвенированием белка была определена дисульфидная модель биологически активного белка - 1-4 и 2-3, где цистеины нумеруются последовательно от amino-окончания. Эта цистеиновая модель с поперечными связями согласуется с известной дисульфидной моделью родственной молекулы эритропоэтина.

#### D. Биологическая активность рекомбинантного сложенного ТРО

Сложенный и очищенный ТРО обладает активностью при исследовании вне организма и в организме. Например, при анализе Ba/F3 половинно-максимальное стимулирование инкорпорации тимидина в клетки Ba/F3 для ТРО (Met<sup>1</sup> 1-153) было достигнуто при 3,3 пг/мл (0,3 пМ). В ELISA на базе mpl-рецептора половинно-максимальная активность наблюдалась при 1,9 нг/мл (120 пМ). В нормальных и миелоугнетенных животных, облученных почти смертельной дозой рентгеновского излучения, сложенный ТРО (Met<sup>1</sup> 1-153) имел высокий потенциал (активность была видна уже при дозах 30 нг/мышь) стимуляции продуцирования новых тромбоцитов. Подобная биологическая активность наблюдалась для других форм ТРО, уложенных в соответствии с вышеописанной методикой (см. Фиг.25, 26 и 28).

#### 14. Способы измерения тромбопоэтической активности

Тромбопоэтическая активность может быть измерена различными методами анализа, включая Ba/F3-анализ лиганда mpl, описанный в Примере 1, анализ ответного синтеза мышинных тромбоцитов, метод инициирования антигенов клеточной поверхности тромбоцитов с измерением антитромбоцитов (anti-GPIIb/IIIa) для мегакариобластической клеточной линии человеческой лейкемии (CMK) [см. Sato et al., Brit. J. Haematol., 72:184-190 (1989)] (см. также жидкостно-сuspензионный анализ мегакариоцитопоза, описанный в Примере 4) и метод инициирования полиплоидизации в мегакариобластической клеточной линии (DAMI)- [см. Ogura et al., Blood, 72(1):49-60 (1988)]. Развитие мегакариоцитов из незрелых, в основном не синтезирующих ДНК клеток, в морфологически идентифицируемые мегакариоциты представляет собой процесс, включающий появление цитоплазматических органелл, выработку мембранных антигенов (GPIIb/IIIa) эндорепликацию и высвобождение тромбоцитов, как описано в "Предпосылках изобретения". Предположительно, должен существовать видо-специфический промотор (т.е. лиганд mpl) развития мегакариоцитов, иницирующий хотя бы некоторые из этих изменений в незрелых мегакариоцитах, ведущих к высвобождению и ослаблению тромбоцитопении. Таким образом, были разработаны различные виды анализа для измерения этих параметров в незрелых клеточных линиях мегакариоцитов, т.е. в клетках CMK и DAMI. Анализ CMK (Пример 4) исследует появление специфического маркера тромбоцитов, GPIIb/IIIa, и распространение тромбоцитов. Анализ DAMI (Пример 15) измеряет эндорепликацию с момента увеличения плоидности и пробы на зрелые мегакариоциты. Распознаваемые мегакариоциты имеют величины плоидности 2N, 4N, 8N, 16N, 32N и т.д. Наконец, анализ мышинных ответных тромбоцитов, проводимый в организме (Пример 16) полезен для проверки действия вводимых исследуемых соединений (здесь лиганда mpl) на рост количества тромбоцитов.

Для измерения активности ТРО были разработаны два дополнительных метода анализа вне организма. Первый - активация рецептора киназы (KIRA) ELISA, при котором клетки CHO заражаются химерой mpl-Rse, и тирозин-фосфорилированный Rse измеряется методом ELISA после действия на mpl-участок химеры лиганда mpl (см. Пример 17). Второй метод - ELISA на основе рецептора, в котором чашка ELISA, покрытая кроличьим античеловеческим IgG захватывает mpl-IgG человеческого химерического рецептора, который связывается с исследуемым лигандом mpl. Биотинилированное поликлональное антитело кролика к лиганду mpl (TPO<sub>15S</sub>)



используется для обнаружения связанного лиганда mrl, который измеряется с использованием стрептавидин-пероксидазы, как описано в примере 18.

15. Биологический отклик в организме нормальных и сублетально облученных мышей, обработанных ТРО. Нормальные и сублетально облученные мыши обрабатывались усеченной формой и полным ТРО, изолированным из клеток яичника китайского хомяка (CHO), E. coli и человеческих эмбриональных почечных клеток (293). Обе формы ТРО, полученного из клеток трех хозяев, стимулировали продуцирование тромбоцитов у мышей, однако, ТРО полной длины, изолированный из CHO, по всей видимости, продуцировал наибольший отклик в организме. Эти результаты показывают, что для оптимальной активности в организме может быть необходима соответствующее гликозилирование карбокси-конечного домена.

(a) E. coli-rhTPO<sub>(Met<sup>-1</sup>, 153)</sub>

"Met"-форму домена ЕРО (Met в позиции -1 плюс первые 153 остатка человеческого ТРО), продуцированную в E. coli (см. Пример 23) вводили ежедневно нормальной самке мыши C57 B6, как описано в пояснениях к Фиг.25А, 25В и 25С. Эти рисунки показывают, что негликозилированная усеченная форма ТРО, продуцированного в E. coli и сложенного, как описано выше, способна стимулировать примерно двукратное увеличение продуцирования тромбоцитов у нормальной мыши без влияния на популяцию красных или белых кровяных телец.

Та же молекула, вводимая ежедневно сублетально облученной (<sup>137</sup>Cs) самке мыши C57 B6, как описано в пояснениях к Фиг.26А, 26В и 26С, стимулировала восстановление тромбоцитов и устранила их полный упадок, но не оказала никакого эффекта на эритроциты или лейкоциты.

(b) CHO-rhTPO<sub>332</sub>

ТРО полной длины, полученный из клеток CHO и вводимый ежедневно нормальной самке мыши C57 B6, как описано в пояснениях к Фиг.27А, 27В и 27С, стимулировал примерно пятикратное увеличение продуцирования тромбоцитов у нормальной мыши без влияния на популяцию красных или белых кровяных телец.

(c) CHO-rhTPO<sub>332</sub>, E. Coli-rhTPO<sub>(Met<sup>-1</sup>, 153)</sub>, 293-rhTPO<sub>332</sub> и E. coli-rhTPO<sub>155</sub>

Были построены кривые отклика на дозу при обработке нормальной мыши rhTPO, полученного из различных клеточных линий (CHO-rhTPO<sub>332</sub>, E. coli-rhTPO<sub>(Met<sup>-1</sup>, 153)</sub>, 293-rhTPO<sub>332</sub> и E. coli-rhTPO<sub>155</sub>), как описано в пояснении к Фиг.28. Этот рисунок показывает, что все испытанные формы молекулы стимулируют продуцирование тромбоцитов, однако форма полной длины, полученная из CHO, имеет наивысшую активность в организме.

(d) CHO-rhTPO<sub>153</sub>, CYO-rhTPO - "усеченная" и CHO-rhTPO<sub>332</sub>

Были также построены кривые отклика на дозу при обработке нормальной мыши различными формами rhTPO, полученного из клеток CHO (CHO-rhTPO<sub>153</sub>, CYO-rhTPO "усеченная" и CHO-rhTPO<sub>332</sub>), как описано в пояснении к Фиг.29. Эта фигура показывает, что все испытанные формы молекулы стимулируют продуцирование тромбоцитов, однако форма полной длины (70кДа) имеет наивысшую активность в организме.

16. Общий способ приготовления лиганда mrl и его вариантов

Предпочтительно лиганд mrl получают по стандартной методике рекомбинации, которая включает продуцирование полипептида лиганда mrl путем культивирования клеток, подвергнутых трансфекции, для экспрессии нуклеиновой кислоты лиганда mrl (обычно путем трансформации клеток вектором экспрессии) и извлечения полипептида из клеток. Однако, было сделано предположение, что лиганд mrl может быть получен путем гомологичной рекомбинации, или при помощи методики рекомбинантного продуцирования, которая использует управляющие элементы, вводимые в клетки, уже содержащие ДНК, кодирующую лиганд mrl. Например, мощный элемент-промотор/усилитель, угнетающий элемент или экзогенный элемент модулирования транскрипции могут быть введены в геном клетки хозяина в приближении и с ориентацией, достаточными для оказания влияния на транскрипцию ДНК, кодирующей нужный лиганд mrl. Не управляющий элемент кодирует лиганд mrl, а сама ДНК соответствует геному хозяйской клетки. Затем можно осуществить просеивание полученных культур для получения клеток, вырабатывающих полипептид рецептора данного изобретения, или для увеличения или уменьшения уровней экспрессии, по желанию.

Таким образом, изобретение предлагает способ получения лиганда mrl, предусматривающий вставку в геном клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты лиганда mrl, элемента модулирования транскрипции, в приближении и с ориентацией, достаточными для оказания влияния на транскрипцию ДНК, кодирующей нужный лиганд mrl, с возможным последующим, этапом культивирования клетки, содержащей элемент модулирования транскрипции и молекулы нуклеиновой кислоты. Изобретение также решает, предлагает хозяйскую клетку, содержащую врожденную нуклеиновую кислоту лиганда mrl, оперативно связываемую с экзогенными управляющими последовательностями, распознаваемыми хозяйской клеткой.

А. Изоляция ДНК, кодирующей полипептид лиганда mrl

ДНК, кодирующая полипептид лиганда mrl, может быть получена из любой библиотеки кДНК, приготовленной из ткани, которая предположительно содержит мРНК лиганда mrl и выражает ее на обнаруживаемом уровне. Ген лиганда mrl может быть также получен из библиотеки геномных ДНК или путем олигонуклеотидного синтеза вне организма из полного нуклеотида или аминокислотной последовательности.

Библиотеки просеиваются в соответствии с зондами, сконструированными для идентификации гена, представляющего интерес, или закодированного им белка. Для библиотек экспрессии кДНК подходящими зондами являются моноклональные или поликлональные антитела, которые распознают лиганды mrl и особым образом с ними связываются. Для библиотек кДНК подходящими зондами являются олигонуклеотиды, состоящие в длину примерно из 20-80 оснований, которые кодируют известные или предполагаемые участки кДНК лиганда mrl из одного и того же или разных видов животных, а также комплементарные или гомологичные кДНК или их фрагменты, которые кодируют тот же или подобный ген. Соответствующие зонды для просеивания библиотек геномных ДНК включают (но не ограничиваются ими) олигонуклеотиды, кДНК или их фрагменты, которые кодируют тот же или подобный ген, и/или гомологичные

геномные ДНК или их фрагменты. Просеивание кДНК или геномной библиотеки при помощи выбранного зонда может проводиться с использованием стандартной методики, как описано в главах 10-12 Sambrook et al., выше.

Альтернативой является изолирование гена, кодирующего лиганд mrl, чтобы использовать методику PCR, как описано в разделе 14 Sambrook et al., выше. Эта методика требует использования олигонуклеотидных зондов, гибридизирующих ДНК, кодирующую лиганд mrl. Способы выбора олигонуклеотидов описаны ниже.

Предпочтительный способ практического осуществления данного изобретения - использование тщательно отобранных олигонуклеотидных последовательностей для просеивания библиотек кДНК из различных тканей, предпочтительно человеческой или свиной почки (взрослой или зародышевой), или клеточных линий печени. Например, библиотеки кДНК клеточных линий человеческой зародышевой печени просеиваются при помощи олигонуклеотидных зондов. Иногда и человеческие геномные библиотеки могут просеиваться при помощи олигонуклеотидных зондов.

Олигонуклеотидные последовательности, выбранные в качестве зондов, должны иметь достаточную длину и быть достаточно недвусмысленными, чтобы избежать ложных результатов. Нужная нуклеотидная последовательность (последовательности) обычно конструируются на основе участков лиганда mrl, имеющих минимальную избыточность кодонов. Олигонуклеотиды могут быть дегенерированы одной или более позициях. Использование дегенерированных олигонуклеотидов особенно важно, если просеивается библиотека, полученная от вида, наличие в котором предпочтительного кодона неизвестно.

Олигонуклеотид должен быть помечен, так чтобы он мог быть обнаружен после гибридизации с ДНК в просеиваемой библиотеке. Предпочтительный способ введения метки - использование АТР (например,  $\gamma^{32}\text{P}$ ) и полинуклеотидной киназы для мечения радиоактивным изотопом конца 5' олигонуклеотида. Однако могут быть использованы и другие способы мечения олигонуклеотида, включая, например, биотинилирование или энзимную метку.

Особый интерес представляет нуклеиновая кислота лиганда mrl, кодирующая полипептид лиганда mrl полной длины. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя природную сигнальную последовательность лиганда mrl. Нуклеиновая кислота, содержащая всю последовательность, кодирующую белок, получают просеиванием выбранных библиотек кДНК или геномных библиотек с использованием выведенной аминокислотной последовательности.

В. Варианты аминокислотной последовательности природного лиганда mrl

Варианты аминокислотной последовательности природного лиганда mrl получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК лиганда mrl или путем синтеза вне организма желаемого полипептида лиганда mrl. Такие варианты включают, например, делеции, вставки или замещения в остатках аминокислотной последовательности свиного лиганда mrl. Например, карбокси-конечная часть зрелого лиганда mrl полной длины может быть удалена путем протеолитического расщепления (в организме или вне организма) или путем клонирования и экспрессии фрагмента ДНК, кодирующего лиганд mrl полной длины, для продуцирования биологически активного варианта. Любая комбинация проводимых делеций, вставок и замещений должна быть достигнута в конечной конструкции, с учетом того, чтобы эта конечная конструкция обладала желаемой биологической активностью. Аминокислотные изменения могут также изменять пост-трансляционные процессы лиганда mrl, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования. При конструировании вариантов аминокислотных последовательностей лиганда mrl размещение участков мутаций и природа мутаций будут зависеть от характеристик модифицируемого лиганда mrl. Участки мутаций могут модифицироваться отдельно или группами, например, (1) замещением сначала консервативными аминокислотами, а затем более радикальными, в зависимости от достигнутых результатов, (2) делецией целевого остатка, или (3) вставкой остатков того же или другого класса рядом с выбранным участком, или комбинацией вариантов 1-3.

Удобная методика идентификации определенных остатков или участков полипептида лиганда mrl, выбранных для мутагенеза, называется "мутагенез с аланиновым сканированием", описанный Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 [1989]. Остаток или группа целевых остатков идентифицируется (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяются любой, но предпочтительно нейтральной или положительно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) для оказания влияния на взаимодействие аминокислот с водной средой снаружи клетки. Затем домены, показывающие функциональную чувствительность к замещениям, подвергаются усовершенствованию путем введения тех же или других вариантов рядом или непосредственно в места замещения. Таким образом, в то время как участок введения вариаций аминокислотных последовательностей определяется предварительно, природа мутации не нуждается в предопределении. Например, чтобы оптимизировать действие мутации на данном участке, проводится мутагенез с аланиновым сканированием (или случайный мутагенез) в целевом кодоне или, участке, и выраженные варианты лиганда mrl просеиваются для получения оптимальной комбинации желаемой активности.

Существуют две основные переменные при конструировании вариантов аминокислотных последовательностей: расположение участка мутации и природа мутации. Например, варианты полипептида лиганда mrl включают варианты последовательности лиганда mrl и могут представлять встречающиеся в природе аллели (которые не требуют манипуляций с ДНК лиганда mrl) или предварительно определенные мутантные формы, полученные мутацией ДНК, приводящей к аллели или к варианту, не встречающемуся в природе. В основном, расположение и природа выбранных мутаций будут зависеть от характеристик модифицируемого лиганда mrl.

Делеции аминокислотной последовательности обычно варьируются в диапазоне от 1 до 30 остатков, более предпочтительно от 1 до 10 остатков, и обычно являются смежными. Как альтернатива, делеции аминокислотной последовательности лиганда mrl могут включать часть или целый карбокси-конечный

гликопротеиновый домен. Делеции аминокислотной последовательности лиганда trpI могут также включать один или более из первых 6 аминокислотных остатков зрелого белка. Делеции аминокислотной последовательности могут, возможно, включать один или более остатков в одном или более замкнутых участках, существующих между "спиральными узлами". Смежные делеции обычно производятся в четном количестве остатков, но одиночные или нечетные количества делеции также возможны. Делеции могут вводиться на участках низкой гомологичности между лигандами trpI, имеющими большую степень идентичности последовательности, для модификации активности лиганда trpI. Или же делеции могут вводиться на участках низкой гомологичности между полипептидами человеческого лиганда trpI и лиганда trpI другого млекопитающего, имеющего большую степень идентичности последовательности с человеческим лигандом trpI. Делеции из полипептида лиганда trpI млекопитающего в областях высокой гомологичности с лигандами trpI других млекопитающих, скорее всего, будут модифицировать биологическую активность лиганда trpI более значительно. Число последовательных делеции будет выбираться так, чтобы защитить третичную структуру лигандов trpI в домене, подвергаемом воздействию, например, с-складчатую структуру или р-спираль.

Вставки в аминокислотную последовательность включают аминокислоты/или карбокси-конечные слияния, варьируемые по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто и более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Интрасеквенсные вставки (т.е. вставки внутри последовательности зрелого лиганда trpI) могут составлять в принципе от 1 до 10 остатков, более предпочтительно от 1 до 5 и наиболее предпочтительно от 1 до 3. Примером предпочтительного слияния может служить слияние лиганда trpI или его фрагмента и другого цитокина или его фрагмента. Примеры терминирующих вставок включают зрелый лиганд trpI с N-конечным метионильным остатком, артефакт прямой экспрессии зрелого лиганда trpI в рекомбинантной клеточной структуре, и слияние гетерологичной N-конечной сигнальной последовательности с N-окончением молекулы зрелого лиганда trpI для усиления секреции зрелого лиганда trpI из рекомбинантных хозяйских клеток. Такие сигнальные последовательности в принципе могут быть получены (и, таким образом, гомологичны им) из клеток тех же видов животных, которые содержат хозяйские клетки, используемые для осуществления изобретения. Подходящие последовательности включают STII или lpp для E. coli, альфа-фактор для дрожжей и вирусные сигналы, такие как герпес gD для клеток млекопитающих.

Другие варианты вставок в молекулу лиганда trpI включают слияние с N- или C-окончением лиганда trpI иммуногенных полипептидов (т.е. неэндогенных по отношению к хозяину, в котором производится слияние), например, бактериальных пептидов (бета-лактамаза) или энзима, кодируемого локусом E. coli trp, или дрожжевого белка, и слияния с-окончений с белками, имеющими длинный полупериод существования, такими как постоянные участки иммуноглобулина (или другие участки иммуноглобулина), альбумин или ферритин, как описано в WO 89/02922, публ. 6 апреля 1989.

Третья группа вариантов - варианты аминокислотного замещения. В этих вариантах как минимум один аминокислотный остаток в молекуле лиганда trpI удален и на его место вставлен другой остаток. Участки, представляющие наибольший интерес для мутагенеза замещением включают участки, идентифицируемые как активные участки лиганда trpI и участки, где аминокислоты, найденные в других аналогах, значительно отличаются по объему боковых цепей, заряду или гидрофобности, но где также наблюдается высокая степень идентичности с выбранными участками лигандов trpI различных видов и/или различных животных аналогов лиганда trpI одного вида.

Другими участками, представляющими интерес, являются участки, в которых определенные остатки лигандов trpI различных видов и/или различных животных аналогов лиганда trpI одного вида идентичны. Эти участки, особенно те, которые встречаются в последовательности с как минимум тремя идентичными консервированными участками, замещаются относительно консервативным способом. Эти консервативные замещения показаны в Таблице 3 под заголовком "Предпочтительные замещения". Если такие замещения приводят к изменениям в биологической активности, то тогда проводятся более существенные изменения, называемые в Таблице 3 "Примеры замещений" или описанные ниже для классов аминокислот, после чего проводится просеивание продуктов.

Таблица 3

Первоначальный остаток	Примеры замещений	Предпочтительные замещения
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gin (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu

Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucine	Leu

Существенные модификации в функциях или иммунологической идентичности лиганда trpI выполняются путем выбора замещений, которые значительно различаются по своему влиянию на (a) структуру полипептидного остова в области замещения, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряд или гидрофобность молекулы на целевом участке или (c) объем боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки подразделяются на группы на основе общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| (2) нейтрально-гидрофильные              | Cys, Ser, Thr           |
| (3) кислотные                            | Asp, Glu                |
| (4) основные                             | Asn, Gin, His, Lys, Arg |
| (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи | Gly, Pro                |
| (6) ароматические                        | Trp, Tyr, Phe           |

Неконсервативные замещения будут вызывать перемещения остатков из одной группы в другую. Такие замещенные остатки можно также вводить в участки консервативных замещений или, более предпочтительно, в оставшиеся (незаконсервированные) участки.

В одном варианте осуществления изобретения желательна инактивация одного или более участков протеазного расщепления, которые присутствуют в молекуле. Эти участки идентифицируются путем проверки кодированных аминокислотных последовательностей, в случае трипсина, например, на аргинил или лизинил. После идентификации участков протеазного расщепления они инактивируются к протеолитическому расщеплению путем замещения целевого остатка другим остатком, предпочтительно основным, таким как глутамин, или гидрофобным, таким как серин; делецией остатка; вставкой пролил-остатка непосредственно после целевого остатка.

В другом варианте осуществления любой метионильный остаток, кроме начального метионил сигнальной последовательности, или любой остаток, расположенный среди трех N- или C-конечных остатков, ближайших к каждому такому метионилу, замещается другим остатком (предпочтительно в соответствии с Таблице 3) или удаляется. Альтернативный вариант - вставка 1-3 остатков непосредственно возле такого участка.

Любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании правильной конформации лиганда trpI, также может быть замещен, чаще всего серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения нежелательных поперечных связей, было обнаружено, что первый и четвертый цистеины в еро-домене, нумеруемые от amino-окончания, необходимы для поддержания правильной конформации, а второй и третий - нет. В соответствии с этим, второй и третий цистеины могут быть замещены.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей варианты аминокислотной последовательности лиганда trpI, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают (но не ограничиваются ими) изолирование из натурального источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотных последовательностей) или олигонуклеотид-опосредованный мутагенез, PCR-мутагенез и касетный мутагенез ранее полученного варианта или безвариантной версии полипептида лиганда trpI.

Олигонуклеотид-опосредованный мутагенез - предпочтительный способ для получения замещенных, делеционных и вставочных вариантов ДНК лиганда trpI. Эта технология хорошо известна в данной области и описана Adelman et al., DNA, 2:183 (1983). В кратком изложении, ДНК лиганда trpI изменяется путем гибридизации олигонуклеотида, кодирующего желаемую мутацию, с образцом ДНК, который представляет собой одноцепную форму плазмиды или бактериофага, содержащую неизмененную или природную последовательность ДНК лиганда trpI. После гибридизации при помощи ДНК-полимеразы синтезируется вторая комплементарная цепь образца, который будет вводиться в олигонуклеотидный инициатор и кодировать выбранное изменение в ДНК лиганда trpI.

В основном для этой цели используются олигонуклеотиды длиной не менее 25 нуклеотидов. Оптимальный олигонуклеотид будет содержать от 12 до 15 нуклеотидов, полностью комплементарных образцу с каждой стороны нуклеотида (нуклеотидов), кодирующего мутацию. Это дает гарантию, что олигонуклеотид будет правильно гибридизоваться с одноцепной молекулой ДНК образца. Олигонуклеотиды легко синтезируются с использованием известных технологий, например, описанной в [Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 75:5765 (1978)].

Образец ДНК можно генерировать при помощи векторов, производных от векторов бактериофага M13 [например, промышленно выпускаемые векторы M13mp8 и M13mp19, или векторы, которые содержат одноцепной фаговый источник репликации, как описано в Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Таким образом, ДНК, подлежащая мутации, может быть вставлена в один из этих векторов для генерирования одноцепного образца. Продуцирование одноцепного образца описано в разделах 4.21-4.41 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Cold Spring Laboratory Press, NY 1989].

Как альтернатива, одноцепной образец ДНК может быть генерирован денатурацией. ДНК двухцепного плазмиды с использованием стандартной технологии.

Для изменения природной последовательности ДНК (например, для генерирования вариантов аминокислотной последовательности) олигонуклеотид гибридируют с одноцепным образцом в подходящих условиях гибридизации. После этого добавляют энзим, полимеризующий ДНК, обычно фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, для синтеза комплементарной цепи образца, используя олигонуклеотид в качестве инициатора при синтезе. Затем гетеродуплексная молекула формируется таким образом, что одна цепь ДНК кодирует мутантную форму лиганда *trpI*, а другая цепь (первоначальный образец) кодирует природную, неизмененную последовательность лиганда *trpI*. Эта гетеродуплексная молекула затем переносится в подходящую клетку хозяина, обычно прокариот, такой как *E. coli* JM101. После выращивания клеток их размещают в чашках агарозы и просеивают с использованием олигонуклеотидного инициатора, меченного 32-фосфатом, для идентификации бактериальных колоний, содержащих мутантную ДНК. Мутантный участок после этого удаляется и помещается в соответствующий вектор для продуцирования белка, как правило, в вектор экспрессии того типа, который обычно используется для трансформации соответствующего хозяина.

Описанный выше способ может быть модифицирован таким образом, чтобы в создаваемой гетеродуплексной молекуле обе цепи плазмиды содержали мутации. Модификации будут следующими: одноцепной олигонуклеотид гибридируют с одноцепным образцом, как описано выше. Смесь трех дезоксирибонуклеотидов, дезоксирибоаденозина (dATP), дезоксирибогуанозина (dGTP) и дезоксириботимидина (dTTP) смешивают с модифицированным тио-дезоксирибозитозином, называемым dCTP-(aS) (который может быть получен в Amersham Corporation). Эту смесь добавляют к комплексу образец-олигонуклеотид. После добавления к этой смеси ДНК-полимеразы генерируется цепь ДНК, идентичная образцу, за исключением мутированных оснований. Кроме того, эта новая цепь ДНК будет содержать dCTP-(aS) вместо dCTP, что будет предохранять ее от ограниченного расщепления эндонуклеазой.

После того как цепь образца в гетеродуплексной молекуле будет затронута соответствующим ограниченным энзимом, эту цепь можно подвергнуть расщеплению нуклеазой *ExoIII* или другой соответствующей нуклеазой, минуя ту часть цепи, которая содержит участки, подлежащие мутации. Затем реакция останавливается, и молекула остается лишь частично расщепленной на две отдельные цепи. С использованием ДНК-полимеразы в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотид-трифосфатов, АТФ и ДНК-лигазы формируется двухцепной ДНК-гомодуплекс. Эта гомодуплексная молекула может быть, затем трансформирована в подходящую клетку хозяина, такую как *E. coli* JM101, как описано выше.

ДНК, кодирующая мутантные лиганды *trpI* с более чем одной замещенной аминокислотой, может быть генерирована одним из нескольких способов. Если аминокислоты расположены близко друг к другу в цепи полипептида, их можно подвергнуть мутации одновременно, используя один олигонуклеотид, который кодирует замещения для всех аминокислот. Если, однако, аминокислоты расположены на некотором расстоянии друг от друга (разделены более чем десятком аминокислот), то генерировать один олигонуклеотид, кодирующий все желаемые изменения, трудно. Вместо этого может быть применен один из двух альтернативных способов.

В первом способе генерируется отдельный олигонуклеотид для каждой замещаемой аминокислоты. Затем олигонуклеотиды одновременно гибридируют с одноцепным образцом ДНК, и вторая цепь ДНК, синтезированная из образца, будет кодировать все желаемые замещения аминокислот.

Альтернативный способ включает два или более этапов мутагенеза для получения желаемого мутанта. Первый этап такой же, как для отдельных мутантов: природная ДНК используется в качестве образца, олигонуклеотид, кодирующий первое желаемое замещение аминокислоты (аминокислот), гибридируется с этим образцом и затем генерируется гетеродуплексная молекула ДНК. Второй этап мутагенеза использует мутированную ДНК, полученную в первом этапе, в качестве образца. Таким образом, этот образец уже содержит одну или более мутаций. Олигонуклеотид, кодирующий дополнительные замещения аминокислот, гибридируется с этим образцом, и результирующая цепь ДНК уже кодирует мутации из первого и второго этапов мутагенеза. Эта результирующая ДНК может быть использована, в качестве образца в третьем этапе мутагенеза, и так далее.

PCR-мутагенез также удобен для создания аминокислотных вариантов полипептида лиганда *trpI*. Хотя следующие пояснения относятся к ДНК, понятно, что данная технология применима также к РНК. Технология PCR относится главным образом к следующему процессу (см. Erlich, выше, глава R. Higuchi, p.61-70): если в качестве стартового материала для PCR используются малые количества ДНК-образца, инициаторы, которые слегка отличаются в последовательности от соответствующего участка в образце ДНК, могут быть использованы для генерирования относительно больших количеств специфического фрагмента ДНК, который отличается от последовательности образца только в тех позициях, в которых инициатор отличался от образца. Для введения мутации в ДНК плазмиды один из инициаторов конструируется таким образом, чтобы перекрывать позицию мутации и содержать мутацию; последовательность других инициаторов должна быть идентична последовательности противоположной цепи плазмиды, но эта последовательность может быть размещена в любом месте вдоль ДНК плазмиды. Однако, предпочтительно, чтобы последовательность второго инициатора размещалась в пределах 200 нуклеотидов от первого, так чтобы в конце цепь усиливаемый участок ДНК, связанной с инициаторами, мог быть легко секвенирован. Усиление PCR с использованием описанных пар инициаторов, приводит к появлению популяции фрагментов ДНК, которые отличаются в позиции мутации, определенной инициатором, и, возможно, в других позициях, если при копировании образца возможны ошибки.

Если образец имеет слишком низкий коэффициент продуцирования материала, то в полученном продукте подавляющее большинство фрагментов ДНК инкорпорирует желаемые мутации. Этот продукт используется для замены соответствующего участка в плазмиде, который служит в качестве образца PCR с использованием стандартной технологии ДНК. Мутации в отдельных позициях могут быть введены одновременно, или с использованием мутантного второго инициатора, или путем выполнения второго

процесса PCR с различными мутантными инициаторами и связыванием двух результирующих фрагментов PCR одновременно с фрагментом вектора в трех- (или более)-членное лигирование.

В отдельном примере PCR-мутагенеза образец ДНК плазмиды (мкг) лиnearизуют путем расщепления ограниченной эндонуклеазой, которая распознаёт единственный участок в ДНК плазмиды снаружи участка, подлежащего усилению. Из этого материала 100нг добавляют к смеси PCR, содержащей буфер PCR, который содержит четыре дезоксинуклеотидных трифосфата и включен в набор GeneAmp (полученный от Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT and Emeryville, CA), и 25пмоль каждого олигонуклеотидного инициатора, до конечного объема 50мкл. Реакционную смесь покрывают слоем 35мкл минерального масла, затем денатурируют ее в течение 5 минут при 100°C, быстро переносят на лед и после этого добавляют 1мкл ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (Tag) (5единиц/мкл, получена от Perkin-Elmer Cetus) ниже слоя минерального масла. Затем сосуд с реакционной смесью помещают в DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) (термический циклизатор), запрограммированный следующим образом:

2мин. - 55°C  
30сек. - 72°C, затем 19 циклов в следующем режиме:  
30сек. - 94°C  
30сек. - 55°C  
30сек. - 72°C.

По окончании программы реакционный сосуд вынимают из термического циклизатора и переносят водную фазу в новый сосуд, экстрагируют смесью фенол/хлороформ (50:50об.), осаждают этанолом и извлекают ДНК стандартным способом. Затем полученный материал подвергают соответствующей обработке для вставки в вектор.

Другой способ приготовления вариантов, кассетный мутагенез, основан на методике, описанной в Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985). Начальным материалом является плазмид (или другой вектор), содержащий ДНК лиганда *mpI*, подлежащую мутации. Кодон(ы) в ДНК лиганда *mpI* идентифицируются. С каждой стороны идентифицированного участка мутации должен быть единственный участок для ограниченной эндонуклеазы. Если таких участков не существует, их можно генерировать с использованием вышеописанного олигонуклеотид-опосредованного мутагенеза, чтобы ввести их в соответствующие положения в ДНК лиганда *mpI*. После введения в плазмид участков ограничения плазмид расщепляется в этих участках для лиnearизации. Двухцепной олигонуклеотид, кодирующий последовательность ДНК между участками ограничения, но содержащий желаемую мутацию (мутации), синтезируется с использованием стандартной методики. Две цепи синтезируются отдельно и затем гибридизируются вместе с использованием стандартной методики. Этот двухцепной олигонуклеотид называют кассетой. Кассета сконструирована таким образом, чтобы содержать концы 3' и 5', совместимые с концами лиnearизованного плазмиды, для непосредственного лигирования с плазмидом. Теперь этот плазмид содержит мутированную последовательность ДНК лиганда *mpI*.

#### С. Вставка нуклеиновой кислоты в копируемый вектор

Нуклеиновая кислота (кДНК или геномная ДНК), кодирующая природный полипептид лиганда *mpI* или его вариант, вставляемый в копируемый вектор для дальнейшего клонирования (усиления ДНК) или для экспрессии. Существует много доступных векторов, и выбор соответствующего вектора будет зависеть от (1) того, будет ли он использоваться для усиления ДНК или для экспрессии ДНК; (2) размера нуклеиновой кислоты, вставляемой в вектор и (3) клетки хозяина, подлежащей трансформации вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (усиления ДНК или экспрессии ДНК) и клетки хозяина, с которой он совмещается. Векторы в основном включают (но не ограничиваются этим) один или более следующих компонентов: сигнальная последовательность, источник репликации, один или более генов-маркеров, ген-усилитель, промотор и терминирующая транскрипционная последовательность.

##### (i) Компонент сигнальной последовательности

Лиганд *mpI* данного изобретения может быть выражен не только непосредственно, но также через слияние с гетерологичным полипептидом, предпочтительно сигнальной последовательностью или другим полипептидом, имеющим специфический участок расщепления у N-окончания зрелого белка или полипептида. Чаще всего сигнальная последовательность является компонентом вектора или может быть частью ДНК лиганда *mpI*, вставляемой в вектор. Выбираемая гетерологичная сигнальная последовательность должна быть такой, которая распознается и обрабатывается (т.е., расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой хозяина. Для прокариотических хозяйских клеток, которые не распознают и не обрабатывают природную последовательность лиганда *mpI*, сигнальная последовательность замещается прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или лидеров термостабильного энтеротоксина II. Для дрожжевой секреции природная сигнальная последовательность может быть замещена, например, дрожжевой инвертазой, альфа-фактором или лидерами кислотной фосфатазы, лидером *S. albicans*-глюкоамилазы [EP 362,179, публ. 4 апреля 1990], или сигналом, описанным в WO 90/13646, публ. 15 ноября 1990. В выражении клеток млекопитающих удовлетворительно показывает себя природная сигнальная последовательность (т.е., предпоследовательность лиганда *mpI*, которая регулирует нормальную секрецию лиганда *mpI* из его природных млекопитающих в организме), хотя могут быть пригодны другие сигнальные последовательности млекопитающих, такие как сигнальные последовательности от полипептидов других лигандов *mpI* или от одинаковых лигандов *mpI*, но полученных от разных видов животных; сигнальные последовательности от лиганда *mpI* и сигнальные последовательности от вырабатываемых полипептидов тех же или родственных видов млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал герпесного симплекса gD.

##### (ii) Компонент источника репликации

И векторы экспрессии, и векторы клонирования содержат последовательность нуклеиновых кислот, которая дает возможность вектору воспроизводиться независимо от хромосомной ДНК клетки хозяина, и включает источники репликации или автономно воспроизводимые последовательности. Такие

последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Источник репликации из плазида pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, источник плазида 2c подходит для дрожжей, а различные вирусные источники (SV40, полиома, аденовирус, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Чаще всего источником репликации не является необходимым компонентом для векторов экспрессии млекопитающих (обычно может использоваться источник SV40, только потому, что он содержит промотор ранних стадий).

Большинство векторов экспрессии являются "челночными" векторами, т.к. они способны к репликации как минимум в одном классе организмов, но могут быть перенесены в другой организм для экспрессии. Например, вектор клонируют в *E. coli*, а затем переносят в дрожжи или клетки млекопитающих для экспрессии, даже если он не способен к репликации независимо от хромосом клетки хозяина.

ДНК может быть также усилена путем вставки в геном хозяина. Это легко осуществляется при использовании в качестве хозяина, например, вида *Bacillus*, путем включения в вектор последовательности ДНК, которая комплементарна последовательности, найденной в геномной ДНК *Bacillus*. Трансфекция *Bacillus* этим вектором приводит к гомологичной рекомбинации генома и вставке ДНК лиганда *trpI*. Однако, процесс извлечения геномной ДНК, кодирующей лиганд *trpI*, более сложен, чем извлечение экзогенно копируемого вектора, так как для извлечения ДНК лиганда *trpI* требуется расщепление ограниченным энзимом.

#### (iii) Компонент гена селекции

Векторы экспрессии и клонирования должны содержать ген селекции, называемый также селективным маркером. Этот ген кодирует белок, необходимый для жизнеспособности или роста трансформируемых клеток хозяина, растущих в среде селективной культуры. Клетки хозяина, не трансформированные вектором, содержащим ген селекции, не выживут в среде культуры. Типичный ген селекции копирует белок, который (a) придает сопротивляемость антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) пополняет ауксотрофический дефицит или (c) поставяет жизненно необходимые питательные элементы, отсутствующие в комплексной среде, например, ген, кодирующий D-аланин-рацемазу для *Bacilli*.

Один пример селекционной схемы использует лекарственное средство для прекращения роста клетки хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, выражают белок, придающий сопротивляемость к лекарству и, таким образом, способствующий выживаемости. Примеры такой доминантной селекции используют в качестве лекарств неомицин [Southern et al., *J. Molec. Appl. Genet.*, 1:327 (1982)], микофенольную кислоту [Mulligan et al., *Science*, 209:1422 (1980)] или гидромицин [Sugden et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:410-413 (1985)]. Приведенные выше три примера задействуют бактериальные гены в условиях эукариотического контроля для передачи сопротивляемости к соответствующему лекарству: G418 или неомицину (генетицину), *hyg* (микофенольной кислоте) или гидромицину, соответственно.

Примеры других подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих включают такие гены, которые дают возможность идентификации клеток, способных воспринимать нуклеиновую кислоту лиганда *trpI*, например, дигидрофолат-редуктаза (DHFR) или тимидин-киназа. Трансформанты клеток млекопитающих помещаются в условия селекционного давления, к которому адаптируются уникальным образом только трансформанты, благодаря восприятию ими маркера. Селекционное давление прикладывается путем культивирования трансформантов в условиях, при которых концентрация селекционных агентов в среде последовательно изменяется, приводя к усилению гена селекции и ДНК, кодирующей полипептид лиганда *trpI*. Усиление - процесс, посредством которого гены, требующиеся для продуцирования белка, необходимого для роста, повторяются в виде тандема внутри хромосом последовательных поколений рекомбинантных клеток. Повышенные количества лиганда *trpI* синтезируются из усиленных ДНК.

Например, клетки, трансформированные селекционным геном DHFR, сначала идентифицируются путем культивирования всех трансформантов в питательной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурирующий антагонист, DHFR. После введения дикого DHFR в клеточную линию яичника китайского хомяка (CHO), испытывающую дефицит активности DHFR, подготавливается и размножается соответствующая клетка хозяина, как описано в Urlaub and Chasin, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Трансформированные клетки затем подвергаются действию повышенных уровней Mtx. Это приводит к синтезу большого числа копий гена DHFR и наряду с этим большого числа копий другой ДНК, содержащей векторы экспрессии, такой как ДНК, кодирующей лиганд *trpI*. Эта технология усиления может использоваться с любыми другими клетками хозяина, например, ATCC No.CCL61 CHO-K1, не обладающими сопротивляемостью к присутствующему эндогенному DHFR, если, например, применяется мутантный ген DHFR, высокоустойчивый к Mtx (EP 117,060). Как альтернатива, могут быть селекционированы клетки хозяина (особенно дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или со-трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими лиганд *trpI*, диким белком DHFR или другим селективным маркером, таким как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH); клетки хозяина селекционируют путем их выращивания в среде, содержащей селекционный агент для селективного маркера, такой как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. U.S. Patent No.4,965,199.

Подходящий селекционный ген для использования в дрожжах - ген *trpI*, присутствующий в плазмиде дрожжей YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); или Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. Ген *trpI* предоставляет селекционный маркер для мутантного штамма дрожжей, испытывающего дефицит способности роста в триптофана, например, ATCC No.44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)]. Патология, вызванная *trpI* в геноме хозяйской клетки дрожжей, обеспечивает эффективную среду для - обнаружения трансформаций путем роста в отсутствие триптофана. Подобным образом *Leu2*-дефицитные штаммы дрожжей (ATCC No.20,622 или 38,626) комплементируются известным плазмидом, содержащим ген *Leu2*.

#### (iv) Компонент промотора

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом хозяина и оперативно связан с нуклеиновой кислотой лиганда *mpl*. Промоторы представляют собой нетранслируемые последовательности, расположенные вверх (5') по направлению к началу кода структурного гена (обычно в пределах от 100 до 1000 оснований), которые регулируют транскрипцию и трансляцию определенных последовательностей нуклеиновых кислот, таких как последовательность нуклеиновой кислоты лиганда *mpl*, с которой они оперативно связаны. Такие промоторы обычно относятся к одному из двух классов, индуцирующему или конститутивному. Индуцирующие промоторы - такие, которые инициируют повышенные уровни транскрипции из ДНК под их контролем в ответ на некоторые изменения в условиях культуры, например, присутствие или отсутствие питательного элемента или изменение температуры. В настоящее время известно большое количество промоторов, распознаваемых разнобразными потенциальными хозяйскими клетками. Эти промоторы, оперативно связываются с ДНК, кодирующей лиганд *mpl*, путем удаления промотора из ДНК источника ограниченным энзимным расщеплением и затем вставкой изолированной последовательности промотора в вектор. Как природная последовательность промотора лиганда *mpl*, так и многие гетерологичные промоторы могут использоваться для прямого усиления и/или экспрессии ДНК лиганда *mpl*. Однако, гетерологичные промоторы более предпочтительны, поскольку они обычно дают большую возможность транскрипции и больший выход выраженного лиганда *mpl* по сравнению с природным промотором.

Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяйскими клетками, включают *с*-лактамазу и лактозные промоторные системы [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); and Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], щелочную фосфатазу, триптофан (*trp*)-промоторную систему [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980) and EP 36,776] и гибридные промоторы, такие как *tac*-промотор [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Однако, пригодны также и другие известные бактериальные промоторы. Их нуклеотидные последовательности опубликованы, что дает возможность опытному специалисту оперативно связать их с ДНК, кодирующей лиганд *mpl* [Siebenlist et al., *Cell*, 20:269 (1980)], используя соединители или адаптеры для образования любых требуемых участков ограничения. Промоторы для использования в бактериальных системах также включают последовательность Shine-Dalgarno (*S.D.*), оперативно связываемую с ДНК, кодирующей полипептид лиганда *mpl*.

Для эукариотов известны последовательности промоторов. Предположительно, все эукариотические гены содержат АТ-обогащенный участок, расположенный примерно в районе 25-30 оснований вверх по направлению от участка иницирования транскрипции. Другая последовательность в районе 70-80 оснований вверх, по направлению от участка иницирования транскрипции многих генов представляет собой участок СХСААТ, где Х может быть любой нуклеотид. У окончания 3' большинства эукариотических генов находится последовательность ААТААА, которая может быть сигнальной в дополнение к поли-А-хвосту к окончанию 3' кодирующей последовательности. Все эти последовательности легко вставляются в эукариотические векторы экспрессии.

Примеры подходящих последовательностей промоторов для использования в хозяйских клетках дрожжей, включают промоторы для 3-фосфоглицерат-киназы [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] или другие гликолитические энзимы [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149-30 (1968); and Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], такие как энзолаза, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, гекокиназа, пируват-декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицерат-мутаза, пируват-киназа, триосефосфат-изомераза, фосфоглюкоза-изомераза и глюкокиназа.

Другие дрожжевые промоторы, являющиеся индуцирующими промоторами, которые имеют дополнительное преимущество транскрипции, регулируемой условиями роста, - промотирующие участки алкоголь-дегидрогеназы 2, изоцитохрома С, кислотной фосфатазы, деградационные энзимы, ответственные за азотный метаболизм, металлотионин, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа и энзимы, ответственные за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования в экспрессии дрожжей, описаны также в Hitzeman et al., EP 73,657A. С дрожжевыми промоторами могут также с успехом использоваться дрожжевые усилители.

Транскрипция лиганда *mpl* из векторов в хозяйских клетках млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус куриной оспы [UK 2,211,504, публ. 5 июля 1989], аденовирус (такой как Adenovirus 2), вирус бычьей папилломы, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита-В и наиболее предпочтительно из Simian Virus 40 (SV40); из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, активного промотора или промотора иммуноглобулина, из промоторов теплового удара и из промоторов, в нормальных условиях связанных с последовательностью лиганда *mpl*, при условии, что эти промоторы совместимы с системами хозяйских клеток.

Ранние и поздние промоторы из вируса SV40 удобно получать в виде ограниченного фрагмента SV40, который также содержит вирусный источник репликации SV40. Fiers et al., *Nature*, 273:113 (1978); Mulligan and Berg, *Science*, 209:1422-1427 (1980); Pavlakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7398-7402 (1981). Непосредственный ранний промотор человеческого цитомегаловируса удобно получать в виде ограниченного фрагмента HindIII E. Greenaway et al., *Gene*, 18:355-360 (1982). Система для экспрессии ДНК в клетках млекопитающих с использованием вируса бычьей папилломы в виде вектора описана в U.S. Patent No. 4,419,446; Модификация этой системы описана в U.S. Patent No. 4,601,978. См. также в Gray et al., *Nature*, 295:503-508 (1982) описание способа экспрессии кДНК, кодирующей иммунный интерферон в клетках обезьяны; Reyes et al., *Nature*, 297:598-601 (1982), описание способа экспрессии ДНК человеческого  $\alpha$ -интерферона в клетках мыши при участии промотора тимидин-киназы из вируса герпесного симплекса; Canaan and Berg., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5166-5170 (1982), описание способа экспрессии гена человеческого интерферона  $\alpha$ 1 в клетках мыши и кролика; Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6777-6781 (1982), описание способа экспрессии бактериальных последовательностей CAT в клетках CV-1 обезьяньей почки, куриных эмбриофибробластах, клетках яичника китайского хомяка, клетках HeLa и



мышинных клетках NIH-3T3 с использованием дупликации длинного окончания вируса саркомы Rous в качестве промотора.

(v) Компонент гена-усилителя

Транскрипция ДНК, кодирующей лиганд *mpl* данного изобретения в высших эукариотах, часто увеличивается путем вставки в вектор последовательности гена-усилителя. Усилителями являются цис-активные элементы ДНК, обычно длиной 10-300 оснований, которые действуют на промотор, увеличивая его транскрипцию. Усилители относительно независимы в ориентации и размещении, находясь в положениях 5' [Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:993 (1981)] и 3' [Lusky et al., Mol. Cell Bio., 3:1108 (1983)] к элементу транскрипции, внутри интрона [Banerji et al., Cell, 33:729 (1983)], а также внутри самой кодирующей последовательности [Osborne et al., Mol. Cell Bio., 4:1293 (1984)]. В настоящее время известно много последовательностей усилителей из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, а-фетопротеин и инсулин). Однако обычно используются усилители из вируса эукариотической клетки. Примеры включают усилитель SV40, второй части источника репликации (оснований 100-270), усилитель раннего промотора цитомегаловируса, усилитель полиомы второй части источника репликации и аденовирусные усилители. См. также Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982), описание усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Усилитель может быть сращен с вектором в позициях 5' или 3' кодирующей последовательности лиганда *mpl*, но предпочтительно в позиции 5' от промотора.

(vi) Компонент терминирования транскрипции

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических хозяйских клетках (дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или содержащие, ядра клетки других многоклеточных организмов), содержат также последовательности, необходимые для прекращения транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся на нетранслируемом участке 5' и реже - на нетранслируемом участке 3' эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей лиганд *mpl*.

(vii) Конструирование и анализ векторов

Конструирование подходящих векторов, содержащих один или более перечисленных компонентов, включает стандартную технологию лигирования. Изолированные плазмиды фрагментов ДНК расщепляются, адаптируются и вновь лигируются в форме, требуемой для генерирования нужных плазмидов.

Для анализа, подтверждающего правильность последовательности полученных плазмидов, используются лигирующие смеси, чтобы трансформировать штамм *E. coli* k12 (ATCC No.31,446), а успешные трансформанты отбираются по сопротивляемости ампициллину или тетрациклину. Из трансформантов получают плазмиды, анализируют их путем ограниченного эндонуклеазного расщепления и/или секвенируют по методу Messing et al., Nucleic Acids Res., 9:309 (1981) или по методу Maxam et al., Methods in Enzymology, 65:499 (1980).

(viii) Векторы временной экспрессии

Особенно полезны в практическом осуществлении данного изобретения векторы экспрессии, которые создаются для временной экспрессии в клетках млекопитающих ДНК, кодирующей полипептид лиганда *mpl*. В основном» временная экспрессия включает использование вектора экспрессии, который способен эффективно копироваться в клетке хозяина, так, чтобы клетка накапливала большое количество копий вектора, и, в свою очередь, синтезировала большие количества нужного полипептида, кодируемого вектором экспрессии. Sambrook et al., выше, pp.16.17-16.22. Системы временной экспрессии, включающие подходящий вектор экспрессии и клетку хозяина, удобны для идентификации полипептидов, кодируемых клонированными ДНК, а также для быстрого просеивания таких полипептидов для получения желаемых биологических или физиологических свойств. Таким образом, системы временной экспрессии особенно полезны в данном изобретении в целях идентификации аналогов и вариантов полипептида лиганда *mpl*, которые имеют биологическую активность полипептида лиганда *mpl*.

(ix) Подходящие векторы клеток позвоночных

Другие методики, векторы и хозяйские клетки, подходящие для синтеза лиганда *mpl* в рекомбинантной клеточной культуре позвоночного животного, описаны в Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117,060; и EP 117,058. Особенно полезным плазмидом для экспрессии в клеточной культуре млекопитающих лиганда *mpl* является pRK5 [EP 307,247 U. S. patent No.5,258,287] или pSV16B [PCT Publication No.WO 91/08291].

D. Селекция и трансформация клеток хозяина

Подходящие клетки хозяина для клонирования или экспрессии векторов здесь - прокариоты, дрожжи или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Подходящие прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli*, *Bacilli*, такие как *B. subtilis*, такие виды *Pseudomonas*, как *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, или *Serratia marcescans*. Предпочтительной хозяйской клеткой *E. coli* является *E. coli* 294 (ATCC No.31,446), хотя другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC No.31,537), и *E. coli* W3110 (ATCC No.27,325) тоже пригодны. Эти примеры служат иллюстрацией, но не ограничивают выбор указанными клетками. Предпочтительно клетка хозяина должна вырабатывать минимальное количество протеолитических энзимов. Как альтернатива, могут применяться способы клонирования вне организма, например, PCR или другие реакции полимеразы нуклеиновых кислот.

Кроме прокариотов, подходящими клетками для векторов, кодирующих лиганд *mpl*, могут быть эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные хлебные дрожжи - наиболее часто используемые клетки среди низших эукариотических микроорганизмов. Однако для данного изобретения может использоваться большое количество других сортов, видов и штаммов, таких как *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, Nature, 290:140 (1981); EP 139,383 published 2 May 1985], клетки *Kluyveromyces* [U.S. Patent No.4,943,529] такие как, например, *K. lactis* [Louvencourt et al., J. Bacteriol., 737 (1983)], *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans* и *K. marxianus*, *Yarrowia*

[EP 402,226], *Pichia pastoris* [EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)], *Candida*, *Trichoderma reesia* [EP 244,234], *Neurospora crassa* [Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, - 76:5259-5263 (1979)], и нитевидные грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* [WO 91/00357 published 10 January 1991], и клетки *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn et al., Gene, 26:205-221 (1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)] and *A. niger* [Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)].

Подходящими хозяйскими клетками для экспрессии гликозилированного лиганда *mpl* являются производные от многоклеточных организмов. Такие хозяйские клетки способны к сложным процессам и гликозилирующей активности. В принципе, может работать любая высшая эукариотическая клеточная культура, от позвоночных или непозвоночных животных. Примеры клеток непозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные палочковидные штаммы и варианты и соответствующие допустимые клетки насекомых от таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (москит), *Aedes albopictus* (москит), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка), and *Bombyx mori*. См., например, Luckow et al., BioTechnology, 6:47-55 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., Vol.8 [Plenum Publishing, 1986], pp.277-279; and Maeda et al., Nature, 315:592-594 (1985). Различные вирусные штаммы для трансфекции обычно доступны, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут быть использованы в качестве вируса в соответствии с данным изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Растительные клеточные культуры хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака могут использоваться в качестве хозяйских клеток. Обычно растительные клетки заражаются путем инкубации определенными штаммами бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, которые после соответствующей предварительной обработки содержат ДНК лиганда *mpl*. Во время инкубации растительной клеточной культуры с *A. tumefaciens* ДНК, кодирующая лиганд *mpl*, передается в клетку растения-хозяина так, что она заражается, и при определенных условиях будет выражать ДНК лиганда *mpl*. Кроме того, имеются регуляторные и сигнальные последовательности, совместимые с растительными клетками, такие как последовательность промотора нопалин-синтазы и полиаденилированная сигнальная последовательность. Derpcker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1:561 [1982]. В дополнение к этому, сегменты ДНК, изолированные из верхнего участка гена T-DNA 780, способны активировать или увеличивать уровни транскрипции растительно-экспрессивных генов в рекомбинантной ДНК-содержащей растительной ткани. EP 321,196, публ. 21 June 1989.

Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) в последнее время стало обычной процедурой [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)]. Примеры часто используемых клеточных линий млекопитающих включают линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 [COS-7, ATCC CRL-1651]; линию человеческой эмбриональной почки [293 или 293 клетки, субклонированные для роста во взвешенной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)]; клетки почки детеныша хомяка [BHK, ATCC CCL 10]; клетки-яичника китайского хомяка/-DHFR [CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]; клетки Сертоли мыши [TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)]; клетки почки обезьяны [CV1 ATCC CCL 70]; клетки почки зеленой африканской обезьяны [VERO-76, ATCC CRL-1587]; клетки человеческой цервикальной карциномы [HELA, ATCC CCL 2]; клетки почки собаки [MDCK, ATCC CCL 34]; клетки печени буйволовой крысы [BRL 3A, ATCC CRL 1442]; клетки легкого человека [W138, ATCC CCL 75]; клетки печени человека [Hep G2, HB 8065]; клетки опухоли молочной железы мыши [MMT 060562, ATCC CCL51]; клетки TRI [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)]; клетки MRC5; клетки FS4 и клеточная линия гепатомы человека (Hep G2).

Хозяйские клетки подвергают трансфекции и предпочтительно трансформации вышеописанными векторами экспрессии и клонирования, получаемыми в данном изобретении, затем культивируют в обычной питательной среде, модифицированной соответствующим образом для введения промоторов, выбора трансформантов или усиления генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансфекция заключается в принятии клеткой хозяина вектора экспрессии вне зависимости от того, являются ли какие-либо кодирующие последовательности фактически выраженными. Известны многочисленные способы трансфекции, например,  $\text{CaPO}_4$  и электропорация. О том, что трансфекция прошла успешно, обычно можно узнать по любому признаку функционирования этого вектора в клетке хозяина.

Трансформация означает введение ДНК в организм таким образом, чтобы ДНК была воспроизводимой, при помощи или экстрахромосомного элемента, или хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки хозяина трансформация осуществляется с использованием стандартной технологии, соответствующей такой клетке. Обработка хлоридом кальция, как описано в разделе 1.82 Sambrook et al., выше, обычно используется для прокариотов или других клеток с плохой проницаемостью клеточных стенок. Инфекция *Agrobacterium tumefaciens* используется для трансформации определенных растительных клеток, как описано в Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) и в WO 89/05859, публ. 29 июня 1989. Кроме того, растения могут заражаться с использованием ультразвуковой обработки, как описано в WO 91/00358, публ. 10 января 1991. Для клеток млекопитающих, не имеющих таких стенок, предпочтителен способ осаждения фосфатом кальция, предложенный Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Основные аспекты трансформации систем хозяйских клеток млекопитающих описаны Axel in U.S. Patent No.4,399,216 публ. 16 August 1983. Трансформации в дрожжах обычно проводятся в соответствии с методикой Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) и Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Однако могут быть использованы и другие способы введения ДНК в клетки, такие как ядерная инъекция, электропорация или слияние протопластов.

#### Е. Культивирование клеток хозяина

Прокариотические клетки, используемые для продуцирования полипептида лиганда *mpl* данного изобретения, можно культивировать в разнообразных средах. Промышленно выпускаемые среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium [(MEM), Sigma], RPMI-1640 (Sigma) и Dulbecco's Modified Eagle's

Medium [(DMEM), Sigma] пригодны для культивирования хозяйских клеток. Кроме того, для этого может использоваться любая из сред, описанных в Ham and Wallace, *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes and Sato. *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), U.S. Patent No.4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; или 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/001195; U.S. Patent Re. 30,985; или U.S.S.N. 07/592,107 или 07/592,141, оба от 3 октября 1990, суть которых кратко изложена здесь. Любая из этих сред может быть дополнена, если необходимо, гормонами и/или другими агентами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермический агент роста), солями (хлорид натрия, соли кальция, магния, фосфаты), буферы (такие как HEPES), нуклеозиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственный Gentamycin™), микроэлементы (неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), а также глюкозу или эквивалентный источник энергии. Могут также вводиться любые другие необходимые дополнения в соответствующих концентрациях, известных опытному специалисту. Условия культивирования, такие как температура, pH и другие будут такими же, какие обычно используются для выбранных хозяйских клеток и известны обычному специалисту.

Клетки хозяина, о которых здесь идет речь, включают в себя как клетки, используемые вне организма, так и те, клетки, которые находятся в организме животного-хозяина.

#### F. обнаружение усиления/экспрессии гена

Усиление гена и/или его экспрессия может быть измерена в образце непосредственно, например, обычным южным блоттингом, северным блоттингом для подсчета транскрипций мРНК [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], точечным блоттированием (анализ ДНК) или гибридизацией на месте, использующей соответствующим образом меченные зонды на основе последовательностей данного изобретения. Для этого анализа могут применяться разнообразные метки, чаще всего радиоактивные изотопы, в частности, <sup>32</sup>P. Однако могут быть задействованы и другие технологии, например, использование биотин-модифицированных нуклеотидов для введения в полинуклеотид. Биотин при этом служит участком связывания с авидином или антителами, которые могут быть помечены разнообразными метками, например, радионуклидами, флуоресцерами, энзимами и т.п. Как альтернатива, могут быть задействованы антитела, которые распознают специфические дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК, гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Антитела, в свою очередь, могут быть помечены, а анализ может быть проведен в тех местах, где дуплекс примыкает к поверхности, так что по мере формирования дуплексов на поверхности может быть обнаружено присутствие антитела, связанного с дуплексом.

Альтернативный вариант измерения экспрессии генов иммунологические методы, такие как иммуногистохимическое окрашивание участков ткани и исследование клеточной культуры или жидкостей организма для прямого подсчета экспрессии продукта гена. По технологии иммуногистохимического окрашивания образец клетки препарируется, обычно дегидратацией или фиксацией, с последующей реакцией с мечеными антителами, специфическими для продукта гена; применяемые метки обычно обнаруживаются визуально и представляют собой энзиматические, флуоресцентные, люминесцентные метки и т.п. Особо чувствительная технология окрашивания, пригодная для использования в данном изобретении, описана Hsu et al., *Am. J. Clin. Path.*, 75:734-738 (1980).

Антитела, используемые для иммуногистохимического окрашивания и/или исследования образцов жидкостей, могут быть моноклональными или поликлональными и могут быть получены в любом животном. По обычной технологии получают антитела против природного полипептида лиганда mrl или против синтетического пептида на основе последовательностей ДНК, получаемых в данном изобретении, как описано ниже.

#### G. Очистка полипептида лиганда mrl

Лиганд mrl предпочтительно извлекают из среды культуры в виде вырабатываемого полипептида, хотя он также может быть получен из лизатов клетки хозяина при непосредственной экспрессии без секреторного сигнала.

Когда лиганд mrl выражается в рекомбинантной клетке иначе, чем человеческий оригинал, это значит, что лиганд mrl полностью свободен от белков или полипептидов человеческого оригинала. Однако, как правило, лиганд mrl все еще нуждается в очистке от других белков или полипептидов рекомбинантной клетки, чтобы получить в основном гомогенные препараты. На первом этапе среду или лизат культуры центрифугируют для удаления частиц и клетки. Затем отделяют мембранные и растворимые белковые фракции. В качестве альтернативного варианта, может применяться промышленно выпускаемый фильтр белковой концентрации (ультрафильтрационные элементы Amicon или Millipore Pellicon). Затем лиганд mrl может быть очищен от растворимых белковых фракций и от мембранных фракций лизата культуры, в зависимости от того, является ли лиганд mrl связанным с мембраной. После этого лиганд mrl очищают от посторонних растворимых белков и полипептидов путем высаливания и обменной или хроматографической методики, используя различные гелевые матрицы. Эти матрицы включают: акриламид, агарозу, декстран, целлюлозу и другие, обычные для очистки белков. Примеры хроматографических методик, подходящих для очистки белков, включают: метод иммуносродства (моноклональное антитело анти-лиганда, mrl), метод рецепторсродства (mrl-IgG или белковая A Sepharose), гидрофобная интерактивная хроматография (HIC) (эфирная, бутильная или фенильная Toyopearl), лектиновая хроматография (Con A-Sepharose, лентил-лектин-Sepharose), метод размерного исключения (Sephadex G-75), катионо- и анионообменные колонки (DEAE или карбоксиметили сульфопропил-целлюлоза) и обращенно-фазовая жидкостная хроматография высокой разрешающей способности (RP-HPLC) [см. Urdal et al., *J. Chromatog.*, 296:171 (1984)], где для очистки рекомбинантного человеческого 11-2 используются два последовательных этапа RP-HPLC. Другие этапы очистки могут включать: осаждение этанолом; осаждение сульфатом аммония; хроматофокусировка; подготовительная SDS-PAGE и т.п.

Варианты лиганда mrl, в которых остатки удалены, вставлены или замещены, извлекают теми же способами, что и природный лиганд mrl, принимая в расчет существенные изменения в свойствах, вызванные вариациями. Например, слияние лиганда mrl с другим белком или полипептидом, например,

бактериальным или вирусным антигеном, улучшает очистку; для адсорбирования слитого полипептида может быть использована колонка иммуносродства, содержащая антитело к антигену. Для абсорбирования варианта лиганда mrl путем связывания его с как минимум одним остаточным иммунным эпитопом применяются колонки иммуносродства, такие как колонка поликлонального анти-лиганда mrl кролика. Альтернативный вариант очистки лиганда mrl - хроматографией сродства с использованием очищенного mrl-IgG, соединенного с (предпочтительно) иммобилизованной смолой, такой как Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Richmond, CA) или подобной при помощи известных методик. Также может быть применен ингибитор протеазы, такой как фенолметилсульфонилфторид (PMSF), для ингибирования протеолитической деградации, во время очистки, а для предотвращения роста случайных примесей могут вводиться антибиотики. Необходимо помнить, что способы очистки, подходящие для природного лиганда mrl, могут требовать модификации с учетом изменений характера лиганда mrl или его вариантов после экспрессии в рекомбинантной клеточной культуре.

#### Н. Ковалентные модификации полипептида лиганда mrl

Ковалентные модификации полипептидов лиганда mrl также рассматриваются данным изобретением. Как природный лиганд mrl, так и варианты его аминокислотной последовательности могут быть модифицированы по ковалентным связям. Первый тип ковалентных модификаций, рассматриваемых данным изобретением - фрагмент лиганда mrl. Фрагменты лиганда mrl величиной до 40 аминокислотных остатков могут быть легко получены химическим синтезом или энзимным или химическим расщеплением полипептида лиганда mrl полной длины или его варианта. Другие типы ковалентных модификаций лиганда mrl или его фрагментов вводятся в молекулу путем реакции целевого аминокислотного остатка лиганда mrl или его фрагмента с органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-конечными остатками.

Цистеиниловые остатки чаще всего реагируют с р-галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусной кислотой или хлорацетамидом, образуя карбоксиметильные или карбоксиамидометильные производные. Цистеинильные остатки также модифицируются реакцией с бромтрифторацетоном, р-бром-с-(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, р-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Производные гистидильных остатков получают реакцией с диэтилпирокарбонатом при pH5,5-7,0, поскольку этот агент относительно специфичен для гистидильной боковой цепи. Также используется пара-бромфенилбромид; реакция предпочтительно проводится в 0,1М каодилата натрия при pH6,0.

Лизинильные и аминоконечные остатки реагируют с сукциновыми или другими ангидридами карбоновых кислот. Модификация этими агентами дает эффект изменения заряда лизинильного остатка. Другие подходящие реагенты для модификации аминокислотных остатков включают имидозефир, такие как метилпиколинимидат; пиридоксалфосфат; пиридоксал; хлорборогидрид; тринитробензолсульфоновая кислота; О-метилизомочевина; 2,4-пентандион, а также катализируемая трансаминазой реакция с глиоксалью.

Аргинильные остатки модифицируются реакцией с одним или несколькими обычными реагентами, такими как фенолглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-огександион и нингидрин. Получение производных аргининовых остатков требует проведения реакции в щелочных условиях из-за высокого pK<sub>a</sub> гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут взаимодействовать с группами лизина и с эпсилон-аминогруппой аргинина.

Может быть проведена специфическая модификация тирозильных остатков; особый интерес представляет введение в тирозильные остатки спектральных меток путем реакции с ароматическими диазониевыми соединениями тетранитрометана. Более часто используются N-ацетилимидзол и тетранитрометан для образования О-ацетилтирозильных видов и 3-нитропроизводных, соответственно. Тирозильные остатки иодинируются с использованием <sup>125</sup>I или <sup>131</sup>I для подготовки меченых белков для использования в радиоиммуноанализе, с использованием методики хлорамина Т, описанной выше.

Группы карбоксильной стороны (аспартил или глутамил) избирательно модифицируются реакцией с карбодиимидами (R-N=C=N-R'), где R и R' - различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамила превращаются в остатки аспарагина и глутаминила реакцией с ионами аммония.

Получение производных взаимодействием с бифункциональными агентами полезно для образования поперечных связей лиганда mrl с водонерастворимой матрицей или поверхностью подложки для использования в методиках очистки антител лиганда mrl, и наоборот. Обычно используемые агенты поперечных связей включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-пентилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные эфиры, например, эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидозефир, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дифенилбис(сукцинимидилпропионат), а также бифункциональные малеимины, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(р-азидофенил)дифенил]пропиоимидат дают фотоактивируемые промежуточные вещества, которые способны образовывать поперечные связи на свету. Как альтернативный вариант, реактивные водонерастворимые матрицы, такие как цианогенные бромид-активируемые углеводороды и реактивные субстраты, описанные в U.S. Patent Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 4,330,440, применяются для иммобилизации белков.

Остатки глутаминила и аспарагина часто деамидируются в соответствующие остатки глутамила и аспарагила. Эти остатки деамидируются в нейтральных или щелочных условиях. Деамидированные формы этих остатков включены в рассмотрение данным изобретением.

Другие модификации включают гидроксирование пролина или лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила и треонина, метилирование р-аминогрупп боковых цепей лизина,

аргинина и гистидина [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)], ацетилирование N-конечного амина и амидирование любой C-конечной карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации полипептида лиганда mrl, рассматриваемый данным изобретением, включает изменение природного гликозилированного образца полипептида. Под изменением подразумевается удаление одного или более углеводородных участков природного лиганда mrl и/или добавление одного или более участков гликозилирования, не присутствовавших в природном лиганде mrl.

Гликозилирование полипептидов типично как для N-связей, так и для O-связей. "N-связь" относится к соединению углеводородного участка к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серина и аспарагин-X-треонина, где X - любая аминокислота за исключением пролиновой, являются последовательностями для распознавания энзиматического соединения углеводородного участка с аспарагиновой боковой цепью. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. "O-связь" гликозилирования относится к соединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамину, чаще всего серину или треонину, хотя могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Дополнение в участках гликозилирования полипептида лиганда mrl обычно довершается изменением аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Изменение может также проводиться путем дополнения в природную аминокислотную последовательность лиганда mrl (в участки O-гликозилирования) одного или более остатков серина или треонина, или замещения ими других остатков. Для простоты, аминокислотная последовательность лиганда mrl предпочтительно изменяется путем изменений на уровне ДНК, в частности мутацией ДНК, кодирующей полипептид лиганда mrl в предварительно выбранных основаниях, так чтобы генерируемые кодоны транслировались в желаемые аминокислоты. Мутации ДНК могут осуществляться способами, описанными выше под заголовком "Аминокислотные последовательности вариантов лиганда mrl".

Другие средства увеличения числа углеводородных участков в лиганде mrl включают химическое или энзимное присоединение гликозидов к полипептиду. Преимущество этих процессов состоит в том, что они не требуют продуцирования в клетке хозяина полипептида, имеющего способность к N- или O-гликозилированию. В зависимости от используемого режима присоединения, сахар(ы) может быть присоединен к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как сульфгидрильные группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как ароматические остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти методики описаны в WO 87/05330, публ. 11 сентября 1987, и в Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp.259-306 (1981).

Удаление углеводородных участков, присутствующих в полипептиде лиганда mrl, может быть выполнено химически или энзиматически. Химическое дегликозилирование требует воздействия на полипептид сложной трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к расщеплению большинства сахаров, за исключением связующего сахара (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), оставляя полипептид неповрежденным. Химическое дегликозилирование описано Nakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) и Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Энзимное расщепление углеводородных участков полипептида может быть выполнено при использовании разнообразных эндо- и экзо-гликозидаз, как описано Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно предотвратить при использовании сложного туникамина, как описано Duskin et al., *J. Biol. Chem.*, 257:3105 (1982). Туникамицин блокирует образование протеин-N-гликозидных связей.

Другой тип ковалентной модификации лиганда mrl включает связывание полипептида лиганда mrl с одним из разнообразных небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксипропиленами, способами, описанными в U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337. Полипептиды лиганда mrl, ковалентно связанные с указанными полимерами, называются здесь пегилированными полипептидами лиганда mrl.

Необходимо понимать, что для выбора оптимального из полученных вариантов лиганда mrl для связывания с mrl и получения иммунологической и/или биологической активности, определенной выше, понадобится просеивание. Просеивание проводится для стабильности в рекомбинантной клеточной культуре или в плазме (например, против протеолитического расщепления), высокого сродства к mrl, стабильности к окислению, способности к продуцированию в увеличенных количествах и т.п. Например, изменение в иммунологических свойствах полипептида лиганда mrl, таких как сродство к данному антителу, измеряется путем иммуноанализа конкурирующего типа. Другие потенциальные модификации свойств белка или полипептида, таких как термическая стабильность, гидрофобность или восприимчивость к протеолитической деградации, проводятся способами, хорошо известными в данной области.

#### 17. Основные способы получения антител к лиганду mrl

##### Получение антител

##### (i) Поликлональные антитела

Поликлональные антитела к полипептидам лиганда mrl или их фрагментам главным образом вырабатывают у животных путем многократных подкожных (sc) или внутривенных (iv) инъекций лиганда mrl и адъюванта. При этом может быть полезно конъюгировать лиганд mrl или его фрагмент, содержащий целевую аминокислотную последовательность, с белком, иммуногенным к иммунизируемому виду, например, гемоцианином "keyhole limpet", сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или ингибитором соевого трипсина с использованием- бифункционального или дериватирующего агента, например,

малеимидазолсульфосукцинимидного эфира (конъюгация через цистеиновые остатки), N-гидроксисукцинимид (через лизиновые остатки), глутаральдегида, сукцинового ангидрида,  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  - различные алкильные группы.

Животные иммунизируются против полипептида лиганда mрl или его фрагмента, иммуногенных конъюгатов или производных путем получения 1мг раствора из 1мкг пептида или конъюгаты (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Freund и внутривенной инъекции раствора в нескольких местах. Через месяц животным добавляется от 1/5 до 1/10 первоначального количества пептида или конъюгаты в полном адъюванте Freund путем внутривенной инъекции в нескольких местах. Через 7-14 дней у животных производится отбор крови, и сыворотка исследуется на титр антител лиганда mрl. Животным вводится пептид или конъюгата до тех пор, пока титр не станет постоянным. Предпочтительно, животные усиливаются конъюгатом того же лиганда mрl, но конъюгация проводится с другим белком или при посредстве другого реагента, образующего перекрестные связи. Конъюгаты также могут быть получены в рекомбинантной клеточной культуре в виде слияний белка. Для усиления иммунного отклика также используются агенты агрегации, такие как квасцы.

#### (ii) Моноклональные антитела

Моноклональные антитела получают из популяции в основном гомогенных антител; это значит, что отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, встречающихся в незначительных количествах. Таким образом, определение "моноклональные" означает, что популяция антител не является смесью различных антител.

Например, моноклональные антитела лиганда mрl данного изобретения могут быть получены с использованием методики гибридомы, впервые описанной Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975), или с использованием методик рекомбинантных ДНК [U.S. Patent No.4,816,567 (Cabilly et al.)].

В методике гибридомы мышь или другое подходящее животное-хозяин, например, хомяк, иммунизируется, как описано выше, с образованием лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком, используемым для иммунизации. Как альтернатива, лимфоциты могут иммунизироваться вне организма. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы, используя подходящий связующий агент, такой как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)].

Затем клетки гибридомы, приготовленные таким образом, высеваются и выращиваются в подходящей питательной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если родительские клетки миеломы испытывают дефицит энзимной гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT or HPRT), питательная среда гибридомы, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT) и предотвращать рост HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительные клетки миеломы - те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень экспрессии антител при помощи выбранных клеток, продуцирующих антитела, и чувствительны к среде, например, HAT-среде. Среди предпочтительных можно назвать клеточные линии миеломы мыши, например, производные от опухоли мыши MOPC-21 и MPC-11, поставляемые Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетки SP-2, поставляемые из American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Для продуцирования человеческих моноклональных антител также описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987].

Питательная среда, в которой выращиваются клетки гибридомы, исследуется на продуцирование моноклональных антител против лиганда mрl. Предпочтительно связующая специфичность моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, определяется иммуноосаждением или по методикам связывания вне организма, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или энзимо-связанный иммуноабсорбентный анализ (ELISA).

Связующее сродство моноклонального антитела может быть, например, определено анализом Scatchard из Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После проверки клеток гибридомы на продуцирование антител желаемой специфичности, сродства и/или активности клоны могут субклонироваться путем лимитирующего разбавления и роста с использованием стандартных методик (Goding, выше). Подходящие питательные среды для этой цели включают, например, Dulbecco's Modified Eagle's Medium или RPM1-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут выращиваться в организме животных в виде асцитных опухолей.

Моноклональные антитела, вырабатываемые субклонами, легко выделяют из питательной среды, асцитной жидкости или сыворотки путем обычной иммуноглобулиновой очистки, например, белковой A-Sepharose, гидроксилапатитовой хроматографией, гель-электрофорезом, диализом или хроматографией по сродству.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела данного изобретения, легко изолируется и секвенируется с использованием обычных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы изобретения служат в качестве предпочтительного источника таких ДНК. После изоляции ДНК может быть введена в вектор экспрессии, которым затем заражаются клетки хозяина, такие как обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клетки миеломы, которые не продуцируют белок иммуноглобулина иным способом, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина. ДНК также может быть модифицирована, например, замещением постоянных доменов тяжелых, и легких цепей мыши соответствующими человеческими последовательностями [Cabilly et al., выше; Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 81:6851 (1984)], или ковалентным присоединением к последовательности иммуноглобулина всей кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида или ее части.

Обычно такие неиммуноглобулиновые полипептиды замещаются постоянными доменами антитела изобретения или переменными доменами участка соединения с антигеном антитела изобретения, для создания химерического бивалентного антитела, включающего один участок соединения с антигеном, специфичный для лиганда mrl, а другой участок - специфичный для другого антигена.

Химерические или гибридные антитела могут быть также получены вне организма с использованием известных методик химии синтеза белков, включающих применение перекрестно-связывающих агентов. Например, иммунотоксины могут конструироваться с использованием дисульфидной обменной реакции или с образованием тиоэфирной связи. Примеры подходящих для этой цели реагентов включают имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

Для диагностики антитела изобретения обычно помечают обнаруживаемым элементом. Обнаруживаемым элементом может быть любой элемент, способный продуцировать прямой или косвенный обнаруживаемый сигнал. Например, обнаруживаемым элементом может быть радиоактивный, изотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ , флуоресцентные или хемилюминесцентные соединения, такие как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; радиоактивные изотопные метки, такие, как  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  или  $^3\text{H}$ , а также фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена.

Можно использовать любую методику, известную в данной области для раздельной конъюгации антитела с обнаруживаемым элементом, включая методики, описанные Hunter, et al., *Nature*, 144:945 (1962); David, et al.; *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 5 30:407 (1982).

Антитела данного изобретения могут быть задействованы в любом известном методе анализа, например, анализе конкурентного связывания, прямом и косвенном сэндвич-анализе и анализе иммуноосаждения. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 [CRC Press, Inc., 1987].

Методика конкурентного связывания опирается на способность меченого стандартного образца (которым может быть лиганд mrl или его иммунологически активный участок) конкурировать с испытуемым образцом (лиганд mrl) в связывании с ограниченным количеством антител. Количество лиганда mrl в испытуемом образце обратно пропорционально количеству стандартного образца, связываемого с антителами. Чтобы увеличить возможность определения количества связываемого образца, антитела обычно инсолюбилизируются до или после конкуренции, так, чтобы оба образца, связанные с антителами, можно было легко отделить от стандартного и испытуемого образцов, оставшихся несвязанными.

Сэндвич-анализ включает использование двух антител, каждое из которых способно связываться с различными иммуногенными участками, или эпитопами, определяемого белка (лиганда mrl). В сэндвич-анализе испытуемый образец связывается с первым антителом, иммобилизованным на твердой подложке, а затем к образцу подсоединяется второе антитело, образуя нерастворимый трехслойный комплекс. David & Greene, U.S. Patent No.4,376,110. Второе антитело может быть само помечено обнаруживаемым элементом (прямой сэндвич-анализ) или может быть измерено при посредстве анти-иммуноглобулинового антитела, помеченного обнаруживаемым элементом (косвенный сэндвич-анализ). Например, к сэндвич-анализу относится анализ ELISA, в котором обнаруживаемым элементом является фермент (например, пероксидаза хрена).

#### (iii) Гуманизированные и человеческие антитела

Способы гуманизирования нечеловеческих антител хорошо известны в данной области. В основном, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных из нечеловеческого источника. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют "импортными" остатками, которые обычно берутся из "импортных" переменных доменов. Гуманизация в основном выполняется в соответствии с методикой Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], путем замещения CDR грызунов или последовательностей CDR соответствующими последовательностями человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерическими антителами (Cabilly et al., выше), в которых значительно меньше, чем нетронутых человеческих переменных доменов, содержится замещенных последовательностей из нечеловеческих видов. На практике гуманизированные антитела чаще всего представляют собой человеческие антитела, в который некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых, при создании гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. В соответствии с так называемым методом "улучшенной подгонки", последовательность переменного домена антитела грызуна просеивается в сравнении с целой библиотекой известных последовательностей человеческих переменных доменов. Человеческая последовательность, ближайшая к последовательности грызуна, принимается в качестве человеческого каркаса (FW) для гуманизированного антитела [Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chthia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]. Другой метод использует особые каркасы, производные от общих последовательностей всех человеческих антител из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Этот каркас может быть использован для нескольких различных гуманизированных антител [Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)].

Важно также, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокого сродства к антигену и других желательных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с предпочтительным методом, гуманизированные антитела получают путем анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трех пространственных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Три пространственные модели иммуноглобулина обычно доступны и знакомы специалистам. Доступны также компьютерные программы, которые показывают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных иммуноглобулиновых последовательностей. Просмотр этих вариантов позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании выбранных иммуноглобулиновых последовательностей, т.е., проанализировать остатки,

которые влияют на способность выбранного иммуноглобулина связываться со своим антигеном. Таким образом, остатки FR могут выбираться и сочетаться из общей и импортной последовательностей так, чтобы достигалась желаемая характеристика антитела, например, повышенное сродство к целевому антигену. Чаще всего на связывание с антигеном непосредственно и существенно влияют остатки CDR. Подробнее см. заявку U.S. Serial No.07/934,373, 21 августа 1992, частично являющуюся продолжением заявки Serial No.07/715,272, 14 июня 1991.

В качестве альтернативы, в настоящее время стало возможным продуцирование трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полный набор человеческих антител без вырабатывания эндогенного иммуноглобулина. Например, описано, что гомозиготная делеция гена соединительного участка ( $J_H$ ) тяжелой цепи антитела у химерических и зародышево-мутантных мышей приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенного антитела. Перенос человеческой зародышевой матрицы гена иммуноглобулина в такую мутантную мышь приводит к продуцированию человеческих антител в ответ на антигенную провокацию. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993). Человеческие антитела также могут продуцироваться в фаговых библиотеках [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)].

(iv) Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, которые обладают специфичностью связывания с как минимум двумя различными антигенами. Способы получения бифункциональных антител известны в данной области.

Традиционный способ рекомбинантного получения биспецифических антител основан на соэкспрессии двух иммуноглобулиновых пар тяжелая цепь-легкая цепь, где две тяжелые цепи обладают различной специфичностью [Millstein and Cuello, Nature, 305:537- 539 (1983)]. Из-за случайности выбора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь до 10 различных молекул антител, из которых лишь одна имеет нужную биспецифическую структуру. Очистка нужной молекулы, которая обычно проводится поэтапной аффинной хроматографией, достаточно громоздка, а выход продукта низок. Подобные методики описаны в публикации PCT No.WO 93/08829 (published 13 May 1993) и в Traunecker et al., EMBO, 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим, более предпочтительным способом, переменные домены антитела с желаемой специфичностью связывания (участки связывания антитело-антиген) сливаются с последовательностями постоянных доменов иммуноглобулина. Предпочтительно слияние с постоянным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим как минимум часть шарнирных участков и участков CH2 и CH3. Предпочтительно также, чтобы первый постоянный участок тяжелой цепи (CH1) содержал зону, необходимую для связывания с легкой цепью, присутствующую как минимум в одном слиянии. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если нужно, легкой цепи иммуноглобулина, вставляются в отдельные векторы экспрессии и сотрансфецируются в подходящий организм хозяина. Это обеспечивает большую гибкость при регулировании взаимных пропорций трех фрагментов полипептидов в тех вариантах осуществления, где используются неравные соотношения трех полипептидных цепей для конструкций, обеспечивающих оптимальный выход. Однако, возможна вставка кодирующих последовательностей двух или трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, если экспрессия как минимум двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу, или если соотношения не имеют особого значения. В предпочтительном варианте осуществления, биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания, с одной стороны, и гибридной иммуноглобулиновой пары тяжелая цепь-легкая цепь (обеспечивающей вторую специфичность связывания), с другой стороны. Обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает отделение нужных биспецифических соединений от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновых цепей, так как наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает простоту отделения. Этот подход описан в заявке Serial No.07/931,811 от 17 августа 1992.

Подробности о генерировании биспецифических антител см., например, в Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

(v) Гетероконъюгаты антител

Гетероконъюгаты антител также рассматриваются данным изобретением. Гетероконъюгаты антител состоят из двух ковалентно соединенных антител. Такие антитела были, например, предложены для ориентирования действия клеток иммунной системы на нежелательные клетки [U.S. Patent No.4,676,980] и для лечения ВИЧ-инфекции [публикация PCT Nos. WO 91/00360 и WO 92/00373; EP 03089]. Гетероконъюгаты антител могут быть получены с использованием любой методики перекрестных связей. Подходящие агенты перекрестного связывания хорошо известны и описаны в U.S. Patent No.4,676,980, наряду с несколькими технологиями перекрестного связывания.

IV. Терапевтическое использование мегакариоцитопозитического белка лиганда  $\text{mPl}$

Биологически активный лиганд  $\text{mPl}$ , имеющий кроветворную эффекторную функцию и называемый здесь мегакариоцитопозитическим или тромбоцитопозитическим белком (ТРО) может быть использован в стерильном фармацевтическом препарате или составе для стимуляции мегакариоцитопозитической или тромбоцитопозитической активности у пациентов, страдающих тромбоцитопенией из-за нарушений продуцирования, секвестрации или повышенной деструкции тромбоцитов. Связанная с тромбоцитопенией гипоплазия костного мозга (например, апластическая анемия после химиотерапии или трансплантации костного мозга) может эффективно лечиться соединениями данного изобретения, так же как и следующие расстройства: рассеянная интраваскулярная коагуляция (DIC), иммунная тромбоцитопения (ITP) (включая ВИЧ-обусловленную ITP и не-ВИЧ-обусловленную ITP), хроническая идиопатическая тромбоцитопения, врожденная тромбоцитопения, миелодисплазия и тромботическая тромбоцитопения. Кроме того, эти мегакариоцитопозитические белки могут быть полезны при лечении миелопролиферативных



тромбоцитотических расстройств, а также тромбоцитоза из-за воспалительных процессов и дефицита железа.

Области предпочтительного использования мегакариоцитопоэтического или тромбоцитопоэтического белка (ТРО) данного изобретения включают: миелотоксическую химиотерапию для лечения лейкемии или твердых опухолей, миелоабляционную химиотерапию для аутологических или аллогенных трансплантатов костного мозга, миелодисплазию, идиопатическую апластическую анемию, врожденную тромбоцитопению и иммунную тромбоцитопению.

Другие расстройства, излечиваемые мегакариоцитопоэтическими белками данного изобретения, включают дефекты или повреждения тромбоцитов, вызванные употреблением лекарств, отравлением или воздействием искусственных поверхностей. В этих случаях могут применяться данные соединения для стимуляции "высвобождения" новых, "неповрежденных" тромбоцитов. Более полный перечень случаев применения см. "Предпосылки" выше, в частности, разделы (a)-(f) и приведенные ссылки.

Мегакариоцитопоэтические белки настоящего изобретения могут применяться самостоятельно или в сочетании с другими цитокинами, гематopoэтинами, интерлейкинами, агентами роста или антителами для лечения вышеуказанных расстройств и состояний. Так, данные соединения могут применяться в сочетании с другим белком или пептидом, обладающим тромбопоэтической активностью, включая G-CSF, GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-1, IL-3, эритропоэтин (EPO), кит-лиганд, IL-6 и IL-11.

Мегакариоцитопоэтические белки данного изобретения готовятся в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Эта терапевтическая композиция может вводиться внутривенно или через нос или легкие. Композицию можно также принимать парентерально или подкожно, если это необходимо. При систематическом приеме терапевтическая композиция должна быть апиогенной и в парентерально приемлемом растворе, обладающем, благодаря правильному подбору pH, изотоничностью и стабильностью. Эти условия известны специалистам. В кратком изложении, дозированные составы соединений данного изобретения готовятся для хранения или применения путем смешивания соединения, имеющего желаемую степень чистоты, с физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами. Такие материалы нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфаты, цитраты, ацетаты и другие соли органических кислот; антиокислители, такие как аскорбиновая кислота; пептиды низкого молекулярного веса (менее чем 10 остатков), такие как полиаргинин; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинил пирролидинон; аминокислоты, такие как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводороды, включая целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины; комплексоны, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннитол или сорбитол; противоионы, такие как натрий и/или неионические поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Pluronic или полиэтиленгликоль.

От 0,5 до 500 мг соединения или смеси мегакариоцитопоэтического белка в виде свободной кислоты или основания или в виде фармацевтически приемлемой соли смешивается с физиологически приемлемым растворителем, носителем, наполнителем, связующим, консервантом, стабилизатором, ароматизатором и т.д., в соответствии с требованиями принятой фармацевтической практики. Количество активного ингредиента в этих композициях таково, чтобы можно было получить удобную дозировку в определенном диапазоне.

Стерильные композиции для инъекций могут быть составлены в соответствии с обычной фармацевтической практикой. Например, может быть желателен раствор или суспензия активного соединения в растворителе, таком как вода или натуральное растительное масло, например, кунжутное, арахисовое или хлопковое, или синтетический жирный растворитель, такой как этилолеат. Буферы, консерванты, антиокислители и т.д. могут быть введены в соответствии с принятой фармацевтической практикой.

Подходящие примеры поддерживаемо-высвобождаемых препаратов включают, полупроницаемые матрицы или твердые гидрофобные полимеры, содержащие полипептид; матрицы представлены в виде частиц определенной формы, например, пленок или микрокапсул. Примеры таких матриц включают полиэфир, гидрогели [например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат)], как описано Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) and Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) или поли(винилспирт)], полилактиды [U.S. Patent No. 3,773,919, EP 58,481], сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамат [Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)], нерасщепляемый этиленвинилацетат (Langer et al., выше), расщепляемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как Lupron Depot™ (впрыскиваемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролидацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту [EP 133,9BS].

В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, способны высвобождать молекулы более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки за более короткое время. Если капсулированные белки находятся в теле длительное время, они могут денатурироваться или образовывать агрегаты в результате воздействия влаги при температуре выше 37°C, что приведет к потере биологической активности и изменениям в иммуногенности. Поэтому способ стабилизации белка должен зависеть от действующего механизма. Например, если выяснено, что механизм агрегации обусловлен образованием межмолекулярных S-S-связей за счет дисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута путем модификации сероводородных остатков, лиофилизации из кислых растворов, регулирования содержания влаги, использования соответствующих аддитивов и разработки новых полимерных матричных композиций.

Поддерживаемо-высвобождаемые белковые композиции также включают липосомно-захваченный мегакариоцитопоэтический белок. Липосомы, содержащие мегакариоцитопоэтический белок, получают способами, известными из DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641;

японской заявки 83-118008; U.S. Patent Nos. 4,485,045 и 4,544,545; EP 102,324. Обычно применяются липосомы малого (около 200-800 ангстрем) одноламельного типа, содержание липида в котором - более 30% мол. холестерина; для оптимальной терапии мегакариоцитопозитическим белком пропорция регулируется.

Дозировка определяется лечащим врачом, принимая во внимание различные известные факторы, чтобы модифицировать действие лекарства, включая тип и степень тяжести заболевания, вес тела, пол, диету, время и способ приема, использование других медикаментов и другие клинические факторы. Обычно ежедневный прием варьируется от 0,1 до 100 мг/кг веса тела. Предпочтительная дозировка варьируется от 0,1 до 50 мг/кг веса тела. Более предпочтительно, чтобы первоначальная доза составляла 1-5 мг/кг в день. Возможно, дозировочный диапазон будет таким же, как для других цитокинов, в частности, G-CSF, GM-CSF и EPO. Терапевтически эффективные дозы могут быть определены при помощи методик вне организма и в организме.

Предполагается, что без дальнейших пояснений средний специалист, опираясь на предшествующее описание и иллюстративные примеры, сможет в полной мере использовать данное изобретение. Поэтому следующие рабочие примеры следует рассматривать как предпочтительные варианты осуществления изобретения, но не как единственные варианты.

#### Пример 1

##### Частичная очистка свиного лиганда mPl

Тромбоцит-обедненная плазма собирается от нормальных и или апластических анемических свиней. Аплазия свиней получена путем облучения 900 cГр общего облучения тела с использованием линейного ускорителя на 4 мэВ. Облученные свиньи поддерживались 6-8 дней внутримышечными инъекциями цефазолина. Затем их общий объем крови был удален под общим наркозом, гепаринизирован и центрифугирован при 1800×г в течение 30 мин. для получения тромбоцит-обедненной плазмы. Пик стимулирующей активности мегакариоцитов был обнаружен через 6 дней после облучения.

Апластическая свиная плазма, полученная от облученных свиней, обработали NaCl до концентрации 4М и перемешивали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Результирующий осадок удалили центрифугированием при 3800 об/мин в Sorvall RC3B, а супернатант загрузили в колонку Phenyl-Toyopearl (220 мл), уравновешенную в 10М NaPO<sub>4</sub>, содержащем 4М NaCl. Колонку промыли этим буфером до значения A<sub>280</sub><0,05 и элюировали dH<sub>2</sub>O. Пиковый элюированный белок разбавили dH<sub>2</sub>O до проводимости 15 мСм и загрузили в колонку Blue-Sepharose, уравновешенную (240 мл) в PBS. Колонку последовательно промывали 5-ю колоночными объемами PBS с 10М NaPO<sub>4</sub> (pH 7,4), содержащего 2М мочевины. Белки элюировали из колонки 10М NaPO<sub>4</sub> (pH 7,4), содержащего 2М мочевины и 1М NaCl. Пиковый элюированный белок обработали 0,01% октилглюкозид (n-октил-с-D-глюкопиранозидом) и по 1М EDTA и Refablock (Boehringer Mannheim) и поместили непосредственно в тандемно-связанные колонки CD4-IgG [Capon, D.J. et al., Nature 337:525-531 (1989)] и mPl-IgG Ultralink (Pierce) (см. ниже). Колонку CD4-IgG (2 мл) удалили после загрузки образца, а колонку mPl-IgG (4 мл) промыли 10 объемами, содержащими PBS и PBS с 2М NaCl, и элюировали 0,1М глицин-HCl с pH 2,25. Фракции собрали в 1/10 объема 1М Tris-HCl (pH 8,0).

Анализ элюированных фракций из колонки mPl-сродства при помощи SDS-PAGE (4-20%, гель Novex), проводимый в условиях, восстановления, обнаружил присутствие нескольких белков (Фиг.5). Белки с наибольшей интенсивностью серебряного окрашивания имели Mr 66000, 55000, 30000, 28000 и 14000. Чтобы определить, какой из этих белков стимулирует размножение культур клеток Ba/F3-mPl, белки элюировали из геля, как описано в Примере 2.

##### Аффинные колонки Ultralink

10-20 мг mPl-IgG или CD4-IgG в PBS соединяют с 0,5 г смолы Ultralink (Pierce), как описано в инструкции производителя.

##### Конструирование и экспрессия лиганда mPl

Химерическая молекула, содержащая целый внеклеточный домен человеческого mPl (аминокислоты 1-491) и зону Fc молекулы человеческого IgG1, была выражена в клетках 293. Фрагмент кДНК, кодирующий аминокислоты 1-491 человеческого mPl, получили при помощи PCR из библиотеки кДНК человеческой мегакариоцитной клетки CMK и секвенировали. Участок ClaI вставили у конца 5', а участок BstEII у конца 3'. Этот фрагмент клонировали вверх от кодирующей зоны Fc IgG в векторе Bluescript между участками ClaI и BstEII после частичного расщепления продукта PCR при помощи BstEII, поскольку в ДНК, кодирующей внеклеточный домен mPl, присутствуют два других участка BstEII. Участок BstEII ввели в конец 3' mPl-продукта PCR, чтобы зона Fc находилась в рамке с внеклеточным доменом mPl. Конструкцию субклонировали в векторе pRK5-tkneo между участками ClaI и XbaI и трансфецировали в клетки 293 человеческой эмбриональной почки методом фосфата кальция. Клетки отобрали в 0,4 мг/мл G418 и изолировали отдельные клоны. Экспрессию mPl-IgG из изолированных клонов определяли с использованием анализа ELISA, специфического для человеческих Fc. Клон наивысшей экспрессии имел уровень экспрессии 1-2 мг/мл mPl-IgG.

##### Клетки, выражающие Ba/F3 mPl P

кДНК, соответствующую целому кодирующему участку человеческого mPl P, клонировали в векторе pRK5-tkneo с последующей линейризацией при помощи NotI, и трансфецировали в IL-3-зависимую клеточную линию Ba/F3 электропорацией (1×10<sup>7</sup> клеток, 9605Ф, 250 Вольт). Через 3 дня начали селекцию в присутствии 2 мг/мл G418. Клетки селекционировали в виде пулов или отдельных клонов, получаемых лимитирующим разбавлением в 96-луночных чашках. Отобранные клетки обработали RPMI, содержащем 15% FBS, 1 мг/мл G418, 20 мМ Glutamine, 10 мМ HEPES and 100 мкг/мл Pen-Strep. Экспрессию mPl P в отобранных клонах определяли при помощи анализа FACS с использованием поликлонального кроличьего антитела анти-mPl P.

##### Анализ лиганда Ba/F3 mPl

Анализ лиганда mPl проводили, как показано на Фиг.2. Чтобы определить присутствие лигандов mPl из различных источников, клетки Ba/F3 mPl P подвергли IL-3-голоданию в течение 24 часов при плотности клеток 5×10<sup>5</sup> клеток/мл в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и воздухе. После IL-3-голодания клетки

разместили в 96-луночных культивирующих чашках при плотности 50 000 клеток в 200мкл среды с разбавленными образцами или без них и культивировали 24 часа в инкубаторе клеточных культур. 20мкл среды RPMI без сыворотки, содержащей 1мкКи  $^3\text{H}$ -тимидина, добавили в каждую лунку в последние 6-8 часов. Затем клетки собрали на 96-луночные чашки фильтра GF/C и промыли 5 раз водой. Фильтры подсчитали в присутствии 40мкл сцинтиляционной жидкости (Mikroscint 20) в счетчике Top Count.

#### Пример 2

Высокоочищенный свиной лиганд mprl

Протокол элюирования геля

Равные количества очищенного в колонке сродства лиганда mprl (фракция 6, элюированная из колонки mprl-IgG) и буфера 2X Laeagali смешали при комнатной температуре без восстановительного агента и загрузили в 4-20% полиакриламидный гель Novex так быстро, как только возможно. Образец не нагревали. В качестве контрольного образца параллельно испытывали буфер без лиганда. Гель выдерживали при 4-6°C и 135В в течение примерно 2 1/4 часа. Первоначально буфер имел комнатную температуру. Затем гель вынули из бокса и удалили пластину с одной стороны геля.

Реплику геля получили на нитроцеллюлозе следующим образом: кусочек нитроцеллюлозы смочили дистиллированной водой и аккуратно положили наверх лицевой стороны геля для выхода пузырьков воздуха. На нитроцеллюлозу и пластину геля нанесли сравнительные метки, чтобы реплику можно было аккуратно переместить после окрашивания. Примерно через 2мин. нитроцеллюлозу осторожно удалили, а гель завернули в пластиковую обертку и поместили в рефрижератор. Нитроцеллюлозу окрасили золотым Biorad протеиновым красителем, сначала примешивая его в 3x10мл 0,1% Tween 20+0,5M NaCl+0,1M Tris-HCl pH7,5 в течение примерно 45 минут с последующей промывкой водой 3x10мл около 5 минут. Затем добавили золотой краситель и оставили, пока полосы в образцах не стали видимыми. После этого реплику промыли водой, поместили сверху пластиковой обертки на гель и аккуратно совместили сравнительные метки. На пластине геля отметили позиции стандартов Novex и нарисовали линии для обозначения позиций разреза. Нитроцеллюлозу и пластиковую обертку удалили, а гель разрезали вдоль . обозначенных линий острым лезвием. Разрезы продолжили за пределы образца, чтобы их можно было использовать для определения позиций слоев геля при окрашивании. После удаления слоев оставшийся гель обработали серебряным красителем и измерили позиции стандартов и метки разрезов. Молекулярный вес, соответствующий каждой позиции разреза, определили по стандартам Novex.

12 слоев геля распределили по ячейкам в двух электроэлюаторах Biorad модели 422. В ячейках использовали отсекающие мембранные колпачки на молекулярный вес 12-14K. Буфером служила смесь 50мМ бикарбоната аммония + 0,05% SDS (pH около 7,8). Один литр буфера перед использованием охлаждали около 1 часа в холодильной камере при 4-6°C. Слои геля элюировали при 10мА/клетку (первоначально 40В) в холодильной камере при 4-6°C.

Элюирование заняло около 4 часов. Затем клетки осторожно удалили, а жидкость над фриттой удалили при помощи пипетки. Элюирующую камеру сняли, а всю имеющуюся над мембранным колпачком жидкость удалили пипеткой. Жидкость в мембранном колпачке удалили при помощи Pipetman и сохранили. Объемы по 50мкл чистой воды помещали в колпачки, перемешивали и удаляли, пока не растворились все кристаллы SDS. Полученные растворы объединили с сохраненными жидкостями. Общий объем, полученный после элюирования, составил 300-500мкл на слой геля. Образцы поместили в 10-мм систему диализа Spectrapor 4 на 12-14тыс., которая вымачивалась несколько часов в чистой воде. Диализ проводился в течение ночи при 4-6°C в 600мл физиологического раствора с фосфатным буфером (примерно 4мМ PBS в калии) на 6 образцов. На следующее утро буфер заменили и продолжали диализ еще 2,5 часа. Образцы затем вынули из резервуаров и поместили в трубки микроцентрифуги. Трубки положили на лед на 1час, затем микроцентрифугировали при 14тыс.об/мин в течение 3мин. и аккуратно отделили надосадочные жидкости от осаденного SDS. Затем надосадочные жидкости поместили на лед еще примерно на 1 час и снова микроцентрифугировали 4 минуты. Надосадочные жидкости разбавили в физиологическом растворе с фосфатным буфером и подвергли анализу активности. Остальные образцы заморозили при -70°C.

#### Пример 3

Микросеквенирование лиганда mprl

Фракцию 6 (2,6мл), элюированную из колонки сродства mprl-IgG), концентрировали на Microcon-10 (Amicon). Для предотвращения абсорбирования лиганда mprl на Microcon, мембрану промыли 1% SDS и добавили 5мкл 10% SDS к фракции 6. Буфер 2X (20мкл) добавили к фракции #6 после концентрации (20мкл) и загрузили общий объем (40мкл) на отдельную дорожку 4-20% градиентного акриламидного геля (Novex). Гель выдерживали в соответствии с протоколом Novex. Затем гель уравнивали в течение 5 минут перед электроблоттингом в 10мМ буфере 3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновой кислоты (CAPS), pH11,0, содержащем 10% метанола. Электроблоттинг на мембранах Immobilon-PSQ (Millipore) проводили в течение 45мин. при 250мА постоянного тока в ячейке переноса Bio-Rad Trans-Blot (32). Мембрану PVDF окрашивали 0,1% Coomassie Blue R-250 в 40% метаноле и 0,1% уксусной кислоте в течение 1мин. и 2-3мин. обесцвечивали 10% уксусной кислотой в 50% метаноле. Единственный видимый белок в диапазоне блета Mr 18000-35000 имел Mr 30000, 28000 и 22000.

Полосы при 30, 28 и 22кДа подвергли белковому секвенированию. Автоматизированное секвенирование белков выполнялось на секвенаторе Applied Biosystem модели 470A, оснащенном анализатором PTH. Секвенатор модифицировали для введения 80-90% образца [Rodríguez, J. Chromatogr., 350:217-225 (1985)]. К раствору А добавили ацетон (около 12мкл/л) для балансировки абсорбции ультрафиолетового излучения. Электроблотируемые белки секвенировали в картридже Blott. Пики интегрировали при помощи программ Justice Innovation с использованием интерфейсов Nelson Analytical 970. Интерпретацию последовательностей выполняли на VAX 5900 [Henzel et al., J. Chromatogr., 404:41-52 (1987)]. N-конечные последовательности (остатки обозначены буквами; неопределенные остатки приведены в круглых скобках) и количество полученного материала (в квадратных скобках) представлены в таблице 2'.

Таблица 2'

**Амино-конечные  
последовательности лиганда mPl**

<b>30 kDa</b> (1.8 pmol)	
1 5 10 15 20 25	
(S)PAPPA(C)DPRLNKLRRDD(H/S)VLH(G)RL	послед.№30
<b>28 kDa</b> (0.5 pmol)	
1 5 10 15 20 25	
(S)PAPPAXDPRLNKLRRDD(H)VL(H)GR	послед.№31
<b>18-22 kDa</b> (0.5 pmol)	
1 5 10	
XPAPPAXDPRLX(N)(K)	послед.№32

**Пример 4****Жидкостно-суспензионный анализ мегакариоцитопозза**

Человеческие периферические стволовые клетки (PSC) (полученные от согласных пациентов) разбавили в 5-кратном размере средой IMDM (Gibco) и центрифугировали в течение 15мин. при комнатной температуре при 800×г. Гранулы клеток ресуспендировали в IMDM и распределили слоем на 60% Percoll (Pharmacia) (плотность 1.077г/мл) и центрифугировали при 800×г в течение 30мин. Моноядерные клетки низкой плотности аспирировали на поверхность раздела, дважды промыли IMDM и разместили слоем при 1-2×10<sup>6</sup> клеток/мл в среде IMDM, содержащей 30% FBS (конечный объем 1мл) в 24-луночных кластерах культур тканей (Costar). APP или APP с удаленным лигандом mPl добавляли до 10% и выращивали культуры 12-14 дней в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> и воздухе. Культуры также выращивались в присутствии 10% APP с 0,5мкг mPl-IgG, добавляемой на 0, 2 и 4 день. Лиганд mPl удаляли из APP путем прохождения APP через колонку сродства mPl-IgG.

Для количественной оценки мегакариоцитопозза в этих жидкостно-суспензионных культурах использовалась модификация Solberg et al., и задействовались меченое радиоактивными изотопами мышинное моноклональное антитело IgG (HP1-1D) к GPIIb/IIIa (предложенное Dr. Nichols, Mayo Clinic). 100мкг HP1-1D [см. Grant, B. et al., Blood 69:1334-1339 (1987)] поместили 1мКи радиоактивного изотопа Na<sup>125</sup>I с использованием Enzymobeads (Biorad, Richmond, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Меченое HP1-1D хранили при -70°C в PBS, содержащем 0,01% октилглюкозида. Типичная специфическая активность составляла 1-2×10<sup>6</sup> импульсов в мин./мкг (>95% осаждено 12,5% трихлоруксусной кислотой).

Жидкостно-суспензионные культуры для каждой экспериментальной точки были утроены. Через 12-14 дней 1мл культур перенесли в 1,5-мл трубки Эппендорфа и центрифугировали при 800×г в течение 10мин. при комнатной температуре, а результирующие гранулы клеток ресуспендировали в 100мкл PBS, содержащего 0,02% EDTA и 20% телячьей сыворотки. 10нг <sup>125</sup>I-HP1-1D в 50мкл буфера добавили к ресуспендированным культурам и выдерживали в инкубаторе в течение 60мин. при комнатной температуре (RT) со встряхиванием через случайные интервалы времени. После этого клетки собрали путем центрифугирования при 800×г в течение 10мин. при комнатной температуре и дважды промыли буфером. Гранулы подсчитывали в течение 1мин. в гамма-счетчике (Packard). Неспецифическое связывание определяли путем добавления 1мкг немеченых HP1-1D в течение 60мин. Специфическое связывание определяли как общее количество связанных <sup>125</sup>I-HP1-1D минус <sup>125</sup>I-HP1-1D, связанные в присутствии избытка немеченых HP1-1D.

**Пример 5****Инициаторы олигонуклеотидов PCR**

На основе аминоконечной аминокислотной последовательности, полученной из белков 30кДа, 28кДа и 18-22кДа, были сконструированы дегенеративные олигонуклеотиды для использования в качестве инициаторов реакции цепи полимеразы (PCR) (см. таблице 4). Было синтезировано два, пула инициаторов: позитивный 20-мерный пул, кодирующий аминокислотные остатки 2-8 (mPl 1) и обратный 21-мерный пул, комплементарный к последовательностям, кодирующим аминокислоты 18-24 (mPl 2).

Таблица 4

**Пулы инициаторов  
дегенеративных олигонуклеотидов**

mPl 1:5' CCN GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (2 048-дегенерат. складка)	послед.№35
mPl 2:5' NCC RTG NAR NAC RTG RTC 3' (2 048-дегенерат. складка)	послед.№36

Свиную геномную ДНК, изолированную из периферических кровяных свиных лимфоцитов, использовали в качестве модели для PCR. 50мкл реакционной смеси содержали: 0,8мкг свиной геномной ДНК в 10мМ Tris-HCl (pH8,3), 50мМ KCl, 3мМ MgCl<sub>2</sub>, 100мкг/мл BSA, 400мкМ dNTP, 1мкМ каждого пула инициаторов и 2,5 единиц полимеразы Taq. Начальная температура денатурации составляла 94°C в течение 8мин., после чего следовали циклы 45сек. при 94°C, 1мин. при 55°C и 1мин. при 72°C. Последняя обработка составляла 10мин. при 72°C. Продукты PCR отделили электрофорезом на 12% полиакриламидном геле и визуализировали путем окрашивания этидия бромидом. Разумно было предположить, что, если аминоконечная

аминокислотная последовательность кодируется отдельным экзоном, то правильный продукт PCR будут составлять 69 нуклеотидных пар. Фрагмент ДНК такого размера был элюирован из геля и субклонирован в рGEMT (Promega). Последовательности трех клонов показаны в таблице 5.

Таблица 5

Фрагменты (из 69 оснований) свиной геномной ДНК	
<b>gemT3</b>	
5'CCAGCGCCGC_CAGCCTGTGA CCCCGACTC CTAAATAAAC TGCCTCGTGA	
3'GGTCGCGGCG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTATTTG ACGGAGCACT	
TGACCACGTT CAGCACGGC [69 bp] (послед. №37)	
ACTGGTGCAA GTCGTGCCG (послед. №38)	
<b>gemT7</b>	
5'CCAGCACCTC_CGGCATGTGA CCCCGACTC CTAAATAAAC TGCTTCGTGA	
3'GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTATTTG ACGAAGCACT	
CGACCACGTC CATCACGGC [69 bp] (послед. №39)	
GCTGGTGCA GTAGTGCCG (послед. №40)	
<b>gemT9</b>	
(послед. №32)	P R L L N K L L R
5'CCAGCACCGCCGGCATGTGACCCCGACTCTAAATAAACTGCTTCGTGACG	
3'GGTCGTGGCGGCCGTACACTGGGGCTGAGGATTATTTGACGAAGCACTGC	
ATCATGTCTATCACGGT 3' (послед. №41)	
TAGTACAGATAGTGCCA 5' (послед. №42)	

Позиции инициаторов PCR обозначены подчеркнутыми основаниями. Эти результаты удостоверяют N-конечную последовательность, полученную для аминокислот 9-17 белков 30, 28 и 18-22кДа и показывают, что эта последовательность кодируется отдельным экзоном свиной ДНК.

#### Пример 6

Ген человеческого лиганда mrl

На основе результатов Примера 5 был разработан и синтезирован 45-мерный дезоксиолигонуклеотид, названный rR45, для просеивания геномной библиотеки. 45-мер имеет следующую последовательность:

S'GCC-GTG-AAG-GAC-GTG-GTC-GTC-ACG-AAG-CAG-TTT-ATT-TAG-GAG-TCGS' (послед. №28)

Этот олигонуклеотид был помечен <sup>32</sup>P-изотопом при помощи (<sup>32</sup>P)-ATP и киназы T4 и использован для просеивания человеческой геномной библиотеки ДНК в λgem12 в нестрогих условиях гибридизации и промывки (см. Пример 7). Позитивные клоны собрали, очистили и проанализировали методами ограниченного картирования и южного блоттинга. Клон #4 выбрали для дополнительного анализа.

Фрагмент BamHI-XbaI (2,8кб), гибридизированный с 45-мером, субклонировали в pBluescript SK-. Было выполнено частичное секвенирование этого клона с использованием в качестве инициаторов олигонуклеотидов, специфических для последовательности ДНК свиного лиганда mrl. Полученная последовательность подтвердила, что ДНК, кодирующая человеческий гомолог свиного лиганда mrl, изолирована. В последовательности был обнаружен участок ограничения EcoRI, что позволило изолировать фрагмент EcoRI-XbaI (390 оснований) из BamHI-XbaI субклонировать его в pBluescript SK-.

Обе цепи этого фрагмента были секвенированы. Последовательность человеческой ДНК и выведенная аминокислотная последовательность показаны на Фиг.9 (номера последовательностей: 3 и 4). Предсказанные позиции интронов в геномной последовательности также показаны стрелками и - определяют предполагаемый экзон ("экзон 3").

Исследование предсказанной аминокислотной последовательности подтверждает, что остаток серина является первой аминокислотой в зрелом лиганде mrl, что следует из прямого анализа аминокислотной последовательности. Сразу вверх за этим кодоном начинается предсказанная аминокислотная последовательность, которая, предположительно, является сигнальной последовательностью, участвующей в секреции зрелого лиганда mrl. Этот кодирующий участок сигнальной последовательности, вероятно, оканчивается интроном в нуклеотидной позиции 68.

В направлении 3' экзон, по-видимому, оканчивается в позиции 196. Таким образом, этот экзон кодирует последовательность из 42 аминокислот, 16 из которых предположительно являются частью сигнальной последовательности, а 26 - частью зрелого человеческого лиганда mrl.

#### Пример 7

кДНК человеческого лиганда mrl полной длины

На основе последовательности человеческого "экзона 3" (Пример 6) были синтезированы два недегенеративных олигонуклеотида, соответствующих концам 3' и 5' последовательности "экзона 3" (Таблица 6).

Таблица 6

Инициаторы PCR недегенеративного  
олигонуклеотида человеческой ДНК

Прямой инициатор:  
5' GCT AGC TCT AGA AAT TGC TCC TCG TGG TCA TGC TTC T 3' послед. №43  
Обратный инициатор:  
5' CAG TCT GCC GTG AAG GAC ATG G 3' послед. №44

Эти два инициатора были использованы в реакциях PCR как модель ДНК из различных библиотек человеческих кДНК или 1нг Quick Clone cDNA (Clonetech) из различных тканей, с использованием условий, описанных в Примере 5. Ожидаемый размер правильного продукта PCR - 140 оснований. После анализа продуктов PCR на 12% полиакриламидном геле был обнаружен фрагмент ДНК ожидаемого размера в библиотеках кДНК, полученных из взрослой почки, клеток 293 зародышевой почки и кДНК, полученной из человеческой зародышевой печени (Clonetech cat. #7171-1).

Библиотека кДНК, полученной из человеческой зародышевой печени, в  $\lambda$  DR2 (Clonetech cat. #HL1151x) была просеяна с тем же 45-мерным олигонуклеотидом, используемым для просеивания человеческих геномных библиотек. Олигонуклеотид пометили при помощи ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-АТФ и полинуклеотидной киназы T4. Библиотеку просеяли в нестрогих условиях гибридизации. Фильтры прегибридизировали в течение 2 часов, затем гибридизировали с зондом в течение ночи при 42°C в 20% формамиде, 5xSSC, 10xDenhardt's, 0,05M фосфата натрия (pH6,5), 0,1% пироглутамата натрия, 50мг/мл обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося в течение 16 часов. Фильтры промыли в 2xSSC, а затем промыли в 0,5xSSC, 0,1% SDS при 42°C. Фильтрами воздействовали на рентгеновскую пленку Kodak в течение ночи. Позитивные клоны собрали, очистили и определили размер вставки при помощи PCR с использованием олигонуклеотидов, оканчивающихся фрагментами BamHI-XbaI, клонированными в  $\lambda$ DR2 (Clonetech cat. #6475-1). 5мкл фарового штамма использовали в качестве источника модели. Начальная денатурация проводилась 7мин. при 94°C с последующими 30 циклами усиления (1мин. при 94°C, 1мин. при 52°C и 1,5мин. при 72°C). Последняя обработка составляла 10мин. при 72°C. Клон #FL2b содержал вставку 1,8кб и был выбран для дальнейшего анализа.

Плазмид pDR2 (Clonetech,  $\lambda$ DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, p.42), содержащийся внутри плеча фара XDR2, был извлечен, как описано в инструкции производителя (Clonetech,  $\lambda$ DR2 & pDR2 cloning and Expression System Library Protocol Handbook, p.29-30). Анализ по методу ограничения плазмиды pDR2-FL2b с фрагментами BamHI и XbaI, показал наличие внутреннего участка ограничения BamHI во вставке примерно в позиции 650. Расщепление плазмиды с BamHI-XbaI разделило вставку на два фрагмента, один 0,65кб и другой – 1,15кб. Последовательность ДНК определяли при помощи трех различных классов моделей, производных от плазмиды pDR2-FL2b. Секвенирование двухцепной ДНК плазмиды проводилось при помощи автоматизированного флуоресцентного секвенатора AB1373 (Applied Biosystems, Foster City, California) с использованием стандартного протокола для меченных окрашиванием дидезоксирибонуклеотидных трифосфатных терминаторов (окрашенных терминаторов) и синтезируемых на заказ блуждающих инициаторов [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467 (1977); Smith et al., Nature, 321:674-679 (1986)]. Прямое секвенирование фрагментов плазмиды, усиленных реакцией цепи полимеразы осуществляли при помощи секвенатора ABI373 с использованием заказных инициаторов и реакций окрашенных терминаторов. Одноцепные модели генерировали при помощи вектора M13 Oanus [DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin] [Burland et al., Nucl. Acids Res., 21:3385-3390 (1993)]. Фрагменты BamHI-XbaI (1,15кб) и BamHI (0,65кб) изолировали из плазмиды pDR2-FL2b, концы заполнили T4 ДНК-полимеразой в присутствии дезоксирибонуклеотидов, затем субклонировали в зону SmaI вектора M13 Janus. Секвенирование проводили по стандартному протоколу для меченных окрашиванием универсальных и обратных инициаторов M13, или блуждающих инициаторов и окрашенных терминаторов. Ручные реакции секвенирования проводились на одноцепной ДНК M13 с использованием блуждающих инициаторов и стандартной химической технологии дидезокси-терминаторов [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467 (1977)],  $^{32}\text{P}$ -меченных p-dATP и Sequenase [United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio]. Связывание последовательности ДНК производилось при помощи Sequencher V2.1b12 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Нуклеотидная и выведенная последовательности hML представлены на Фиг.1 (номер последовательности: 1).

#### Пример 8

Изоляция гена человеческого лиганда mpl (TPO)

Клоны человеческой геномной ДНК гена TPO изолировали путем просеивания человеческой геномной библиотеки в  $\lambda$ -Gem12 с pR45, ранее описанным олигонуклеотидным зондом в нестрогих условиях (см. Пример 7) или в строгих условиях, с фрагментом, соответствующим половине 3' последовательности человеческой кДНК для лиганда mpl (от участка BamHI до конца 3'). Были изолированы два перекрывающихся  $\lambda$ -клона, занимающие 35кб. Два перекрывающихся фрагмента (BamHI and EcoRI), содержащие целый ген TPO, были субклонированы и секвенированы. Структура человеческого гена включает 6 экзонов в пределах 7кб геномной ДНК (Фиг.14A, B и C). Границы всех экзон/интронных соединений согласуются с общим раппортом, установленным для генов млекопитающих [Shapiro, M. B., et al., Nucl. Acids Res. 15:7155 (1987)]. Экзон 1 и экзон 2 содержат нетранслируемую 5'-конечную последовательность и 4 первых аминокислоты сигнального пептида. Остальная часть секреторного сигнала и первые 26 аминокислот зрелого белка кодируются экзоном 3. Целый карбоксильный домен и 3'-нетранслируемая последовательность, а также около 50 аминокислот эритропоэтин-подобного домена кодируются экзоном 6. Четыре аминокислоты, участвующие в делеции, наблюдаемой внутри hML-2 (hTPO-2) находятся у конца 5' экзона 6.

#### Пример 9

Временная экспрессия человеческого лиганда mpl (hML)

Чтобы субклонировать вставку полной длины, содержащуюся в pDR2-FL2b, плазмид расщепили при помощи XbaI до конца, затем частично расщепили при помощи BamHI. Фрагмент ДНК, соответствующий вставке 1,8кб, очистили в геле и субклонировали в pRK5 (pRK5-hmpl I) [см. в U.S. Patent No.5,258,287

конструкцию pRK5] под контролем цитомегаловирусного раннего промотора. ДНК из pRK5-hmpl I получили методом PEG и трансфецировали в человеческие эмбриональные клетки почки 293 в среде Eagle's, модифицированной Dulbecco's (DMEM), дополненной питательной смесью F-12, 20мМ HEPES (pH7,4) и 10% зародышевой бычьей сыворотки. Клетки трансфецировали по методике фосфата кальция, как описано в [Gorman, C. (1985) in DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D. M., ed) Vol. II, pp.143-190, IRL Press, Washington, D. C]. Через 36 часов после трансфекции супернатанты зараженных клеток исследовали на активность методом пролиферативного анализа (см. Пример 1). Супернатанты клеток 293, зараженных вектором pRK, не дали стимуляции клеток Ba/F3 или Ba/F3-mpI (Фиг.12A). Супернатанты клеток, зараженных pRK5-hmpl I, не оказали действия на клетки Ba/F3, но резко стимулировали размножение клеток Ba/F3-mpI (Фиг.12A), показав, что эта кДНК кодирует функционально активный человеческий лиганд mpI.

#### Пример 10

##### Изоформы человеческого лиганда mpI hML2, hML3 и hML4

Чтобы идентифицировать различно соединенные формы hML, были синтезированы инициаторы, соответствующие каждому концу кодирующей последовательности hML. Эти инициаторы были задействованы в RT-PCR для усиления РНК человеческой взрослой печени. Кроме того, были сконструированы внутренние инициаторы, оканчивающиеся выбранными участками, представляющими интерес (см. ниже), и также были задействованы. Прямое секвенирование концов продукта PCR обнаружило отдельную последовательность, точно соответствующую последовательности кДНК, изолированной из библиотеки человеческой зародышевой печени, см. Фиг.1 (номер последовательности: 1). Однако, участок, находящийся рядом с с-окончанием EPO-домена (в середине продукта PCR), имеет сложную комплексную последовательность, подтверждая существование соединенных вариантов в этом участке. Чтобы изолировать эти соединенные варианты, в PCR в качестве моделей для кДНК человеческой взрослой печени были использованы инициаторы, описанные в таблице 7, присоединяющиеся к концам участка, представляющего интерес.

Таблица 7

##### Инициаторы PCR изоформ человеческого ML

phmpIcdna.3el: 5'TGTGGACTTTAGCTTGGGAGAAATG	послед. №45
phx4.F: 5'GGTCCAGGGACCTGGAGGTTTG3'	послед. №46

Продукты PCR субклонировали с затуплением концов в M13. Секвенирование отдельных субклонов показало существование как минимум трех изоформ ML. Одна из них, hML (также называемая hML<sub>332</sub>) является самой длинной и в точности соответствует последовательности, изолированной из библиотеки зародышевой печени. Последовательности четырех изоформ человеческого лиганда mpI, начиная от самой длинной (hML) и заканчивая самой короткой (hML-4), приведены на Фиг.11 (номера последовательностей 6, 8, 9 и 10).

#### Пример 11

##### Конструкция и временная экспрессия изоформ и замещенных вариантов человеческого лиганда mpI hML2, hML3 и hML(R153A, R154A)

Изоформы hML2 и hML3 и замещенный вариант hML(R153A, R154A) были получены от hML с использованием рекомбинантной технологии PCR, описанной Russell Higuchi в PCR Protocols, A guide to Methods and Applications, Acad. Press, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky L T.J. White Editors.

Во всех конструкциях используемые "внешние" инициаторы показаны в таблице 8, а "перекрывающиеся" инициаторы - в таблице 9.

Таблица 8

##### Внешние инициаторы

Cla.F1.F2: 5'ATC GAT GAT GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G3'	послед. №47
HMPIL-R: 5'GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA3'	послед. №48

Таблица 9

##### Прикрывающиеся инициаторы

hML-2:	послед. №49
MLA4.F 5'CTC CTT GGA ACC CAG GGC AGG ACC 3'	послед. №50
MLA4.R 5'GGT CCT GCC CTG GGT TCC AAG GAG 3'	послед. №51
hML-3:	послед. №52
hMLA116+ 5'CTG CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT 3'	послед. №53
hMLA116 - 5'AAT CCA GAA GTC CTT TCC TCG GAG CAG 3'	послед. №54
hML(R153A, R154A)	
RR-KO-F: 5'CCC TCT GCG TCG CGG CGG CCC CAC CCA C 3'	
RR-KO-R: 5'GTG GGT GGG GCC GCC GCG ACG CAG AGG G 3'	

Все усиления PCR выполнялись с участием клонированной Pfu ДНК-полимеразы (Stratagene) при следующих условиях: начальная температура денатурации составляла 94°C в течение 7мин., после чего следовало 30 циклов по 1мин. при 94°C, 1мин. при 55°C и 1,5мин. при 72°C. Последняя обработка составляла

10мин. при 72°C. Продукт PCR расщепили ClaI-XbaI, очистили и клонировали в pRKStkneo. Клетки 293 подвергли трансфекции различными конструкциями, как описано выше, и исследовали супернатанты методом пролиферационного анализа Ba/F3-*mpl*. hML-2 и hML-3 не показали обнаруживаемой активности при этом анализе, однако активность hML(R153A, R154A) оказалась подобной активности hML, показывая, что изменения в этом диосновном участке не влияют на активность (см. Фиг.13).

#### Пример 12

кДНК мышинного лиганда *mpl*

mML, mML-2 и mML-3

Изоляция сДНК mML

Фрагмент ДНК, соответствующий целому кодирующему участку человеческого лиганда *mpl*, получили путем PCR, очистили в геле и пометили случайным иницированием в присутствии <sup>32</sup>P-dATP и <sup>32</sup>P-dCTP. Этот зонд был использован для просеивания 10<sup>6</sup> клонов библиотеки кДНК печени мыши в λGT10 (Clontech cat# ML3001a). Фильтры дубликатов гибридизовали в 35% формамиде, 5×SSC, 10×Denhardt's, 0,1% SDS, 0,05M фосфата натрия (pH6,5), 0,1% пиродифосфата натрия, 100мг/мл обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося в течение ночи в присутствии зонда. Фильтры промыли в 2×SSC, а затем промыли в 0,5×SSC, 0,1% SDS при 42°C. Гибридизирующие фаги очистили и вставки кДНК субклонировали в участок Bluescript SK-плазмиды. Клон "LD" со вставкой 1,5кб выбрали для дальнейшего анализа и секвенировали обе цепи, как описано выше для кДНК человеческого ML. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности из клона LD представлены на Фиг.14 (номера последовательностей: 1 и 11). Выведенная последовательность зрелого ML из этого клона имела 331 аминокислотный остаток и идентифицировалась как mML<sub>331</sub> (или mML-2, по причинам, описанным ниже). Значительная идентичность нуклеотидной и выведенной аминокислотной последовательностей наблюдалась в EPO-подобных доменах этих ML. Однако, при совмещении выведенных аминокислотных последовательностей человеческого и мышинного ML оказалось, что мышинная последовательность имеет тетрапептидную делецию между человеческими остатками 111-114, соответствующую делеции 12 нуклеотидов после позиции 618 в человеческой (см. выше) и в свиной (см. ниже) кДНК. В соответствии с этим были исследованы дополнительные клоны для обнаружения возможных изоформ мышинного ML. Один клон, "L7", содержал вставку 1,4кб с выведенной последовательностью 335 аминокислот, содержащей "недостающий" тетрапептид LPLQ. Эта форма, очевидно, является мышинным ML полной длины и называется mML или mML<sub>335</sub>. Нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности для mML представлены на Фиг.16 (номера последовательностей: 12 и 13). Наконец, был изолирован и секвенирован клон "L2". Этот клон содержал делецию 116 нуклеотидов, соответствующую hML3, и поэтому был обозначен mML-3. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей этих двух изоформ показано на Фиг.16.

Экспрессия рекомбинантного mML. Векторы экспрессии для мышинного ML были в основном приготовлены, как описано в Примере 8. Клоны, кодирующие mML и mML-2, субклонировали в pRK5-tkneo, вектор экспрессии млекопитающих, который обеспечивает экспрессию в условиях регулирования промотором CMV и сигналом полиаденилирования SV40. Результирующие векторы экспрессии, mMLpRKtkneo и mML2pRKtkneo, были временно трансфецированы в клетки. 293 при помощи методики фосфата кальция. После временной трансфекции среду кондиционировали в течение 5 дней. Клетки выдержали в высокогликозной среде DMEM, дополненной 10% зародышевой бычьей сыворотки.

Экспрессия мышинного *mpl* (mmpl) в клетках Ba/F3. Стабильные клеточные линии, выражающие с-*mpl*, были получены трансфекцией mmpl pRKtkneo, в основном, как описано для человеческого *mpl* в Примере 1. В кратком изложении, вектор экспрессии (20мкг; линейаризованный), содержащий целую кодирующую последовательность мышинного *mpl* [Scoda, R.C. et al., EMBO J. 12:2645-2653 (1992)], трансфецировали в клетки Ba/F3 электропорацией (5×10<sup>6</sup> клеток, 250 вольт, 960мкФ) с последующей селекцией на сопротивляемость неомицину с 2мг/мл G418. Экспрессию *mpl* получили методом анализа поточной цитометрии с использованием кроличьих антимышинных иммунных сывороток *mpl*-IgG. Клетки Ba/F3 выдерживались в среде RPMI 1640 из клеток WEHI-3B как источника IL-3. Супернатанты из клеток 293, временно трансфецированные mML и mML-2, исследовали в клетках Ba/F3, трансфецированных mmpl, как описано в Примере 1.

#### Пример 13

кДНК свиного лиганда *mpl*

pML и pML-2

кДНК свиного лиганда *mpl* (pML) изолировали при помощи RACE PCR. В кратком изложении, инициатор олигодТ и 2 специфических инициатора были сконструированы на основе последовательности экзона гена свиного ML, кодирующего аминокислотное окончание ML, очищенного из апластической свиной сыворотки. Была получена и усилена кДНК, препарированная из различных апластических свиных тканей. кДНК-продукт PCR длиной в 1342 основания был найден в почке и субклонирован. Несколько клонов секвенировали и обнаружили, что они кодируют зрелый свиной лиганд *mpl* (не включающий сигнальную последовательность). кДНК, как выяснилось, кодирует 332- аминокислотную последовательность зрелого белка (pML<sub>332</sub>), представленную на Фиг.18 (номера последовательностей: 9 и 16).

#### Методика:

Изоляция гена pML и кДНК геномные клоны гена свиного ML изолировали путем просеивания свиной геномной библиотеки в EMBL3 (Clontech Inc.) с pR45. Библиотеку в основном просеивали, как описано в Примере 7. Несколько клонов изолировали и секвенировали экзон, кодирующий аминокислотную последовательность, идентичную полученной из очищенного ML. кДНК свиного ML получили с использованием модификации протокола RACE PCR. Два специфических инициатора ML были сконструированы на основе последовательности гена свиного ML. Полиаденилированную мРНК изолировали из почки апластической свиньи, в основном, как описано ранее. кДНК приготовили обратной транскрипцией с инициатором BamdТ





циркулирующие тромбоциты в образцах крови, полученных от обработанных и контрольных мышей. Подсчет тромбоцитов и лейкоцитов проводили одновременно в крови, полученной из ретро-глазничного синуса.

#### Пример 17

KIRA ELISA для тромбопоэтина (TPO) путем измерения - фосфорилирования химерического рецептора mpl-Rse.gD

Человеческий рецептор mpl был обнаружен Vigon et al., PNAS, USA 89:5640-5644 (1992). Был создан химерический рецептор, включающий внеклеточный домен (ECD) рецептора mpl и трансмембранный (TM) и внутриклеточный домен (ICD) Rse (Mark et al., 3. of Biol. Them. 269(14):10720-10728 [1994]) с карбокси-конечным хвостовым полипептидом (т.е. Rse.gD) для использования в KIRA ELISA. См. на Фиг.30 и 31 схематическое описание данного метода анализа.

#### (a) Подготовка захватывающего агента

Моноклональное антитело anti-gD (клон 5B6) было выработано против пептида из гликопротеина D симплексного вируса герпеса (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6):547-553 [1990]).

Очищенный препарат штамма довели до концентрации 3,0мг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS), pH7,4 и образцы по 1,0мл сохранили при -20°C.

#### (b) Подготовка анти-фосфотирозинового антитела

Моноклональный анти-фосфотирозин, клон 4G10, был получен от UBI (Lake Placid, NY) и биотинилирован с использованием биотин-И-гидроксисукцинимид с длинным плечом (Biotin-X-NHS, Research Organics, Cleveland, OH).

#### (c) Лиганд

Лиганд mpl получали с использованием рекомбинантной технологии, описанной здесь. Очищенный лиганд mpl сохранили при 4°C в виде раствора штамма.

#### (d) Подготовка нуклеиновой кислоты Rse.gD

Синтетические двухцепные олигонуклеотиды были использованы для воссоздания кодирующей последовательности 10 С-конечных аминокислот (880-890) человеческого Rse и дополнения последовательности из 21 аминокислоты, содержащей эпитоп для антитела 5B6 и стопорный кодон. Таблица 10 представляет окончательную последовательность синтетической части слитого гена.

Таблица 10

Синтетическая двухцепная часть человеческого слитого гена Rse

<p>кодирующая цепь:  5'-TGCAGCAAGGGCTACTGCCACACTCGAGCTGCGCAGATGCTAGCCTCAAGA  TGGCTGATCCAAATCGATTCCGCGGCAAGATCTTCCGGTCTCTGTAGAAGCT-3'</p>	послед. №59
<p>некодирующая (обратная) цепь:  5'-AGCTTCTACAGGACCGGAAGATCTTTGCCGCGGAATCGATTTGGATCAGCCA  TCTTGAGGCTAGCATCTGCGCAGCTCGAGTGTGGCAGTAGCCCTTGGTGC-3'</p>	послед. №60

Синтетическую ДНК слили с кДНК, кодирующей аминокислоты 1-880 человеческого гена Rse на участке PstI, начинающемся с нуклеотида 2644 опубликованной последовательности кДНК человеческого Rse [Mark et al., Journal of Biological Chemistry 269(14):10720-10728 (1994)] и участках HindIII в полилинкере вектора экспрессии pSV17.ID.LL (см. Фиг.32 A-L; номер последовательности: 22) для создания плазмиды экспрессии pSV.ID.Rse.gD. В кратком изложении, плазмид экспрессии включает дицистронный первичный транскрипт, содержащий последовательность, кодирующую DHFR, ограниченную 5'-концевым соединительным донорным и 3'-концевым соединительным акцепторным интроновыми участками, за которыми расположена последовательность, кодирующая Rse.gD. Блок полной длины (не соединенный) содержит DHFR в качестве первой открытой рамки считывания и поэтому генерирует белок DHFR, давая возможность селекции стабильных трансформантов.

#### (d) Подготовка нуклеиновой кислоты mpl-Rse.gD

Плазмид экспрессии pSV.ID.Rse.gD, полученный, как описано выше, модифицировали для продуцирования плазмиды pSV.ID.M.tmRd6, который содержит кодирующие последовательности ECD человеческого mpl (аминокислоты 1-491), слитые с трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом Rse.gD (аминокислоты 429-911). Для соединения кодирующей последовательности части внеклеточного домена человеческого mpl с частью кодирующей последовательности Rse использовались синтетические олигонуклеотиды; соединение проводилось при помощи двухступенчатой реакции клонирования PCR, как описано у Mark et al., Journal of Biological Chemistry 267:26166-26171 (1992). Инициаторами, используемыми для первой реакции PCR, были M1.

(5' -TCTCGCTACCGTTTACAG-3' ) (послед. №61)

(5' -CAGGTACCCACCAGGCGGTCTCGGT-3' ) (послед. №62)

с моделью кДНК mpl и R1

(5' -GGGCCATGACACTGTCAA-3' ) (послед. №63)

и R2

(5' -GACCGCCACCGAGACCGCCTGGTGGGTACCTGTGGTCCTT-3' ) (послед. №64)

с моделью кДНК Rse. Часть PvuII-SmaI этого слияния использовалась для конструирования химерического рецептора полной длины.

#### (f) Трансформация клеток

Клетки DP12.CHO (EP 307,247, публ. 15 марта 1989) электропорировали с pSV.ID.M.tnRd6, который был линейаризован в уникальном участке NotI основной цепи плазмиды. ДНК осадили этанолом после экстракции смесью фенол/хлороформ и ресуспендировали в 20мкл 1/10 Tris EDTA. Затем 10мкг ДНК выдерживали в инкубаторе с  $10^7$  клеток CHO DP12 в 1мл PBS на льду в течение 10мин. перед электропорацией при 400В и 330мкФ. Клетки вернули на лед на 10мин. перед размещением в неселективной среде. Через 24 часа клетки подпитали безнуклеозидной средой для отбора стабильных клонов DHFR+.

(g) Отбор трансформированных клеток для использования в KIRA ELISA

Клоны, выражающие MPL/Rse.gD, идентифицировали западным блоттингом целых лизатов клетки, пост-фракционированных при помощи SDS-PAGE, используя антитело 5B6, которое обнаруживает эпитоп gD.

(h) Среда

Клетки выращивали в среде F12/DMEM 50:50 (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). Среда была дополнена 10% диафильтрованным FBS (HyClone, Logan, Utah), 25мМ HEPES и 2мМ L-глутамина.

(i) KIRA ELISA

Клетки DP12.CHO, трансформированные Mpl-Rse.gD, высевали ( $3 \times 10^4$  на лунку) в 96 лунок чашки с плоским дном в 100мкл среды и культивировали в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. На следующее утро отобрали супернатанты из лунок и слегка встряхнули чашки на бумажном полотенце. 50мкл среды, содержащей экспериментальные образцы или 200, 50, 12,5, 3,12, 0,78, 0,19, 0,048 или 0нг/мл лиганда mPl, добавили в каждую лунку. Клетки стимулировали при 37°C в течение 30мин., удалили супернатанты из лунок, и снова слегка встряхнули чашки на бумажном полотенце. Чтобы лизировать клетки и солюбилизовать химерические рецепторы, в каждую лунку добавили 100мкл лизирующего буфера, состоящего из 150мМ NaCl, содержащего 50мМ HEPES (Gibco), 0,5% Triton-X 100 (Gibco), 0,01% тимеросала, 30 иммунизирующих килоед./мл апротинина (ICN Biochemicals, Aurora, OH), 1мМ 4-(2-аминоэтил)- бензолсульфонилфторидгидхлороводорода (AEBSF; ICN Biochemicals), 50рМ лейпептина (ICN Biochemicals) и 2мМ ортованадата натрия (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), pH7,5. Содержимое чашки осторожно перемешали на плоском шейкере (Bellco Instruments, Vineland, NJ) в течение 60мин. при комнатной температуре.

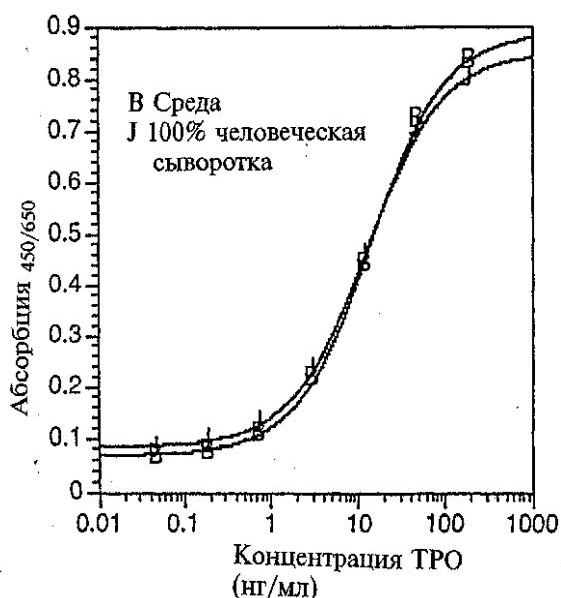
Во время солюбилизации клеток микротитровальную чашку ELISA (Nunc Maxisorp, Inter Med, Denmark), покрываемую в течение ночи при 4°C моноклональным анти-gD антителом 5B6 (5,0мкг/мл в 50мМ карбонатном буфере, pH9,6, 100мкл/лунку), декантировали, встряхнули на бумажном полотенце и блокировали 150мкл/лунку буфером Block Buffer [PBS, содержащий 0,5% BSA (Intergen Company, Purchase, NY) и 0,01% тимеросала] в течение 60мин. при комнатной температуре при легком помешивании. Через 60мин. чашку, покрытую anti-gD антителом 5B6 6 раз промыли промывочным буфером (PBS, содержащий 0,05% Tween-20 и 0,01% тимеросала) с использованием автоматизированного чашкопромывателя (ScanWasher 300, Skatron Instruments, inc, Sterling, VA).

Лизат, содержащий солюбилизованный MPL/Rse.gD, был перенесен из микротитровальных лунок клеточной культуры (85мкл/лунку) в покрытые антителами и блокированные лунки ELISA и помещен., в инкубатор на 2ч. при комнатной температуре с легким помешиванием. Несвязанные mPl-Rse.gD удалили промывкой промывочным буфером 100мкл биотинилированного 4G10 (анти-фосфотирозина) разбавили 1:18000 в разбавительном буфере (PBS, содержащий 0,5% BSA, 0,05% Tween-20, 5мМ EDTA и 0,01% тимеросала), т.е., 56нг/мл добавили в каждую лунку. После инкубации 2ч. при комнатной температуре чашку промыли и добавили в каждую лунку 100мкл конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) стрептавидина (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA), разбавленного 1:60000 в разбавительном буфере. Чашку поместили в инкубатор на 30мин. при комнатной температуре с легким помешиванием. Свободные авидин-конъюгаты вымыли и добавили в каждую лунку 100мкл свежеприготовленного раствора субстрата (тетраметилбензидин [TMB]; 2-компонентный субстратный комплект; Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). Реакция протекала 10 минут, после чего развитие цвета остановили добавлением 100мкл/лунку 1,0М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Было считано абсорбирование при 450нм с началом отсчета при 650нм (ABS<sub>450/650</sub>) при использовании чашечного считывающего устройства vmax (Molecular Devices, Palo Alto, CA), контролируемого программным обеспечением Macintosh Centris 650 (Apple Computers, Cupertino, CA) и DeltaSoft software (BioMetallics, Inc, Princeton, NJ).

Стандартная кривая была получена путем стимуляции клеток dp12.trkA,B или C.gD 200, 50, 12,5, 3,12, 0,78, 0,19, 0,048 или 0нг/мл лиганда mPl и представлена в виде зависимости нг/мл TPO от значений ABS<sub>450/650</sub> +/- стандартное отклонение с использованием программы DeltaSoft. Концентрации образцов были получены путем интерполяции их абсорбирования на стандартную кривую и выражены в виде активности TPO в нг/мл.

Было обнаружено, что лиганд mPl способен активировать химерический рецептор Mpl-Rse.gD концентрационно-зависимым и лиганд-специфическим образом. Кроме того, анализ KIRA-ELISA mPl-Rse.gD проявил толерантность к 100% человеческой сыворотке (показано) или 100% плазме (не показано), что позволяет легко использовать этот анализ для пациентов и образцов рК.

Стандартная кривая 293-продуцируемого TPO<sub>322</sub>



Сводные данные EC50 ТРО

Формы ТРО (клетки)	EC50 (Вес/Объем)	EC50 (молярность)
Hu ТРО 332 (293)	2.56нг/мл	67.4пМ
Mu ТРО 332 (293)	3.69нг/мл	97.1пМ
Hu ТРО 153 (293)	~41нг/мл	~1.08пМ
Hu ТРО 155 (E.coli)	0.44нг/мл	11.6пМ
Hu ТРО 153met (E.coli)	0.829нг/мл	21.8пМ

#### Пример 18

##### ELISA на основе рецепторов для тромбозина (ТРО)

Чашки ELISA покрыли кроличьим F(ab')<sub>2</sub> античеловеческим иммуноглобулином (Fc) в карбонатном буфере с pH 9,6 при 4°C в течение ночи. Чашки блокировали 0,5% альбумином бычьей сыворотки в PBS при комнатной температуре в течение часа. Урожай ферментов, содержащий химерический рецептор, mPl-IgG, добавили в чашки и выдерживали в инкубаторе 2 часа. В чашки добавили двукратно разбавленные растворы (0,39-0,25нг/мл) стандартного образца (ТРО<sub>332</sub>, выработанный в клетках 293, с концентрацией, определенной количественным аминокислотным анализом) и образцов, последовательно разбавленных в 0,5% альбумина бычьей сыворотки, 0,05% Tween 20, и выдерживали в инкубаторе 2 часа. Связанный ТРО обнаруживали при помощи очищенного белка А, биотинилированных кроличьих антител к ТРО<sub>155</sub>, выработанных в E.coli (инкубация 1 час), с последующей обработкой стрептавидин-пероксидазой (инкубация 30 мин.) и применением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в качестве субстрата. Абсорбция была обнаружена при 450 нм. Между этапами чашки промывались. Для анализа данных построили стандартную кривую с использованием программы графопостроителя на 4 параметра Kaleidagraph. Концентрации образцов были высчитаны из стандартной кривой.

#### Пример 19

##### Экспрессия и очистка ТРО из клеток 293

##### 1. Подготовка векторов экспрессии клеток 293

кДНК, соответствующую целой открытой рамке считывания ТРО, получали при помощи PCR с использованием следующих олигонуклеотидов в качестве инициаторов:

Таблица 11

##### Инициаторы PCR 293

Clal, FL.F: 5' ATC GAT ATC GAT CAG CCA GAC ACC CCG GCC AG 3'	послед. №65
hmpII-R: 5' GCT AGC TCT AGA CAG GGA AGG GAG CTG TAC ATG AGA 3'	послед. №48

В качестве модели для реакции в присутствии pfu ДНК-полимеразы (Stratagene) использовали PRK5-hmpl I (описанный в Примере 9). Первоначальная денатурация проводилась при 94°C в течение 7 мин., после чего следовали 25 циклов усиления (1 мин. при 94°C, 1 мин. при 55°C и 1 мин. при 72°C). Последняя обработка составляла 15 мин. при 72°C. Продукт PCR очистили и клонировали между участками ограничения ClaI и XbaI плазмиды pRKStkneo, а производный вектор pRK5 модифицировали для экспрессии гена сопротивления к неомицину под контролем тимидинкиназы, получив вектор pRKStkneo.ORF. Вторую конструкцию, соответствующую ЕРО-гомологичному домену, генерировали тем же способом, но с использованием в качестве прямого инициатора Clal.FL.F, а в качестве обратного инициатора следующий:

Arg.STOP.Xba: 5'TCT AGA TCT AGA TCA CCT GAC GCA GAG GGT GGA CC 3' (послед. №66)

Окончательную конструкцию назвали pRK5tkneo.EPO-D. Последовательности обеих конструкций были верифицированы, как описано в Примере 7.

## 2. Трансфекция клеток человеческой эмбриональной почки

Эти две конструкции трансфецировали в клетки человеческой эмбриональной почки методом  $\text{CaPO}_4$ , как описано в Примере 9. Через 24 часа после трансфекции начали селекционирование неомицин-резистентных клонов в присутствии 0,4мг/мл G418. Через 10-15 дней отдельные клоны перенесли в 96-луночные чашки и оставили клетки расти до слияния. Экспрессию ML<sub>153</sub> и ML<sub>332</sub> кондиционированной среды из этих клонов получили с использованием пролиферативного анализа Ba/F3 (описанного в Примере 1).

## 3. Очистка rhML<sub>332</sub>

Кондиционированную среду 293-rhML<sub>332</sub> загрузили в колонку Blue-Sepharose (Pharmacia), уравновешенную в 10мм растворе фосфата натрия с pH7,4 (буфер А). Затем колонку промыли 10 колоночными объемами, включающими буфер А и буфер А с 2М мочевины. После этого-колонку элюировали буфером А, содержащим 2М мочевины и 1М NaCl. Полученный пул непосредственно перенесли в колонку WGA-Sepharose, уравновешенную в буфере А. Колонку WGA-Sepharose промыли 10 колоночными объемами, содержащими буфер А с 2М мочевины и 1М NaCl, и элюировали тем же буфером, содержащим 0,5М N-ацетил-D-глюкозамин. Элюат загрузили в колонку C4-HPLC (Synchrom, Inc.), уравновешенную в 0,1% TFA. Колонку элюировали с прерывающимся пропанольным градиентом (0-25%, 25-35%, 35-70%). Обнаружилось, что rhML<sub>332</sub> элюируется при градиенте пропанола 28-30%. При помощи SDS-PAGE очищенный rhML<sub>332</sub> мигрирует в виде, широкой полосы на участке геля 68-80кДа (Фиг.15).

## 4. Очистка rhML<sub>153</sub>

Кондиционированную среду 293-rhML<sub>153</sub> загрузили в колонку Blue-Sepharose, как описано для rhML<sub>332</sub>. Элюат из Blue Sepharose непосредственно загрузили в колонку mpI-сродства, как описано выше. rhML<sub>153</sub>, элюированный из колонки сродства, очистили до гомогенности с использованием колонки C4-HPLC в тех же условия, которые описаны для rhML<sub>332</sub>. При помощи SDS-PAGE очищенный rhML<sub>153</sub> разделили на 2 широких и две узких полосы с Mr приблизительно 18,000-21,000 (Фиг.15).

## Пример 20

### Экспрессия и очистка TPO из клеток CHO

#### 1. Описание векторов экспрессии клеток CHO

Векторы экспрессии, используемые в электропорационных протоколах, описанные ниже, имеют следующие обозначения:

PSVI5.ID.LL.MLORF (full length or hTPO332) и

pSVI5.ID.LL.MLEPO-D (truncated or hTPO153).

Представляющие интерес свойства этих плазмидов представлены на Фиг.23 и 24.

#### 2. Подготовка векторов экспрессии клеток CHO

кДНК, соответствующую целой открытой рамке считывания hTPO, получали при помощи PCR с использованием следующих олигонуклеотидов в качестве инициаторов:

Таблица 12

PCR инициаторы вектора экспрессии клеток CHO

Cla. FL.F2: 5' ATC GAT ATC GAT AGC CAG ACA CCC CGG CCA G 3'	послед. №47
ORF. Sal: 5' AGT CGA CGT CGA CGT CGG CAG TGT CTG AGA ACC 3'	послед. №67

В качестве модели для реакции в присутствии pfu ДНК-полимеразы (Stratagene) использовали PRK5-hmpl I (описанный в Примере 9). Первоначальная денатурация проводилась при 94°C в течение 7мин., после чего следовали 25 циклов усиления (1мин. при 94°C, 1мин. при 55°C и 1мин. при 72°C). Последняя обработка составляла 15мин. при 72°C. Продукт PCR очистили и клонировали между участками ограничения ClaI и SalI плазмиды pSVI5.ID.LL для получения вектора pSVI5.ID.LL.MLORF. Вторую конструкцию, соответствующую EPO-гомологичному домену, генерировали тем же способом, но с использованием в качестве прямого инициатора Cla.FL.F2, а в качестве обратного инициатора следующий:

EPQD.Sal 5' AGT CGA CGT CGA CTC ACC TGA CGC AGA GGG TGG ACC 3' (послед. №68)

Окончательную конструкцию назвали pSVI5.ID.LL.MLEPO-D. Последовательности обеих конструкций были верифицированы, как описано в Примерах 7 и 9.

По существу, кодирующие последовательности для лиганда полной длины и усеченного были введены в участок множественного клонирования вектора экспрессии CHO pSVI5.ID.LL. Этот вектор содержит участок раннего промотора/усилителя SV40, модифицированный элемент сращивания, содержащий мышиную кДНК DHFR, участок множественного клонирования для введения нужного гена (в случае описанных последовательностей TPO), сигнал полиаденилирования SV40 и источник репликации и ген бета-лактамазы для селекции плазмиды и усиления в бактериях.

## 3. Методика выведения стабильных клеточных линий CHO, выражающих рекомбинантный человеческий TPO<sub>332</sub> и TPO<sub>153</sub>

### а. Описание родительской клеточной линии CHO

Хозяйская клеточная линия CHO (яичника китайского хомяка), используемая для экспрессии молекул TPO, описанных здесь, известна как CHO-DP12 [см. EP 307,247, публ. 15 марта 1989]. Эта клеточная линия млекопитающих была клонально селекционирована путем трансфекции родительской линии (CHO-K1 DUX-

Bl(DHFR-), полученной от Dr. Frank Lee из Stanford University с согласия Dr.L. Chasin) с вектором, выражающим препроинсулин, для получения клонов с пониженными инсулиновыми требованиями. В этих клетках также отсутствует DHFR, и поэтому могут быть селекционированы клоны для присутствия последовательностей векторов кДНК DHFR путем роста в среде, лишенной нуклеозидных добавок (глицина, гипоксантина и тимидина). Для стабильно выраженных клеточных линий CHO обычно используется такая система селекции.

b. Способ трансфекции (электропорация)

Клеточные линии, выражающие TPO<sub>332</sub> и TPO<sub>153</sub>, генерировали путем трансфекции клеток DP12 при помощи электропорации [см., например, Andreason, G.L. 3. Tiss. Cult. Meth., 15,56 (1993)] с линейаризованными плазмидами pSV15. ID.LL.MLORF или pSVIS-ID-LL-MLEPO-D соответственно. Стандартными методами молекулярной биологии были разработаны три реакционных смеси ограниченных энзимов для расщепления каждого плазида: 10пг, 25пг и 50пг вектора с энзимом NOTI. Этот участок ограничения обнаруживается в векторе только один раз, в зоне линейаризации 3' и снаружи элементов транскрипции лиганда TPO (см. Фиг.23). 100мкл реакционной смеси подвергли инкубации в течение ночи при 37 градусах. На следующий день смесь экстрагировали фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом (50:49:1) и осадили этанолом на сухом льду в течение примерно часа. Осадок центрифугировали 15мин. и высушили. Линейаризованную ДНК ресуспендировали в 50мкл среды Ham's DMEM-F12 1:1, дополненной стандартными антибиотиками и 2мМ глутамина.

Растущие клетки суспензии DP12 собрали, промыли один раз в среде, описанной для ресуспендирования ДНК, и, наконец, ресуспендировали в той же среде при концентрации  $10^7$  клеток на 750мкл. Равные образцы клеток (750мкл) и каждую линейаризованную смесь ДНК выдерживали в инкубаторе вместе при комнатной температуре в течение часа и затем перенесли в электропорационную камеру BRL. Каждую реакционную смесь затем электропорировали в стандартном приборе электропорации BRL при 350В, установленных при 330мкФ и низкой емкости. После электропорации клетки оставили в приборе на 5мин. и затем поместили на лед еще на 10мин. инкубационного периода. Электропорированные клетки перенесли на 60-мм чашки клеточных культур, содержащие 5мл стандартной, полностью проросшей среды для клеток CHO (высокоглюкозная DMEM-F12 50:50 без глицина, с добавкой 1X GHT, 2мМ глутамина и 5% зародышевой телячьей сыворотки) и выращивали в течение ночи в 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе клеточных культур.

c. Способ селекции и просеивания

На следующий день клетки трипсинизировали из чашек стандартным методом и перенесли в 150-мм чашки культур тканей, содержащие селективную среду DHFR Ham's DMEM-F12 1:1, описанную выше, с добавкой 2% или 5% диализированной зародышевой телячьей сыворотки, но без глицина, гипоксантина и тимидина - стандартная селекционная среда DHFR, используемая нами). С каждой 60-мм чашки клетки последовательно переносили в 5/150-мм чашки. Затем клетки поместили в инкубатор на 10-15 дней (с одной переменной среды) при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, пока начавшие появляться клоны не достигли размеров, достаточных для переноса в 96-луночные чашки. Через 4-5 дней клеточные линии- перенесли в 96-луночные чашки с использованием стерильных желтых наконечников пипеток на 50мл. Клетки оставили расти до слияния (обычно 3-5 дней), а затем трипсинизировали поддоны и репродуцировали 2 копии оригинальных поддонов. Две из этих копий на короткий период поместили в морозильник с клетками в каждой лунке, разбавленными в 50мкл 10% FSC в DMSO. Через 5 дней образцы кондиционированной бессывороточной среды перенесли из лунок слияния в третий поддон для экспрессии TPO на основе анализа активности при посредстве клеток Ba/F3. Клоны с наивысшей экспрессией, выявленные на основе этого анализа, вынули из морозильника и внесли в 2 150-мм Т-образные колбы для переноса в группу клеточных культур для адаптации суспензии, повторного анализа и помещения в банк.

d. Протокол усиления

Несколько клеточных линий с наивысшим титром из описанной выше выборки подвергли последовательно режиму стандартного метотрексатного усиления для генерирования клонов с наивысшим титром. Клоны клеток CHO расширили и поместили на 10-см чашки при 4 концентрациях метотрексата (50нМ, 100нМ, 200нМ и 400нМ) и при двух или трех количествах клеток ( $10^5$ ,  $5 \times 10^5$  и  $10^6$  клеток на чашку). Эти культуры поместили в инкубатор при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, пока начавшие появляться клоны не достигли размеров, достаточных для переноса в 96-луночные чашки и для дальнейшего исследования. Несколько клонов с наивысшим титром из этой выборки снова подвергли действию метотрексата, уже повышенной концентрации (600нМ, 800нМ, 1000нМ и 1200нМ), и, как ранее, резистентные клоны оставили для роста и затем перенесли в 96-луночные чашки для анализа.

4. Культивирование стабильных клеточных линий CHO, выражающих рекомбинантный человеческий TPO<sub>332</sub> и TPO<sub>153</sub>

Клетки, помещенные в банк, подвергли оттаиванию и расширили популяцию клеток путем стандартной методики выращивания клеток в содержащей или не содержащей сыворотку среде". После достаточного увеличения плотности клеток, их промыли для удаления лишней среды. Затем клетки культивировали любым стандартным методом, включающим: порцию питательной среды или непрерывную среду при 25-40°C, нейтральную pH, с содержанием кислорода как минимум 5% до накопления устойчиво вырабатываемого TPO. Жидкость клеточной культуры затем отделяли от клеток механическими средствами, например, центрифугированием.

5. Очистка рекомбинантного человеческого TPO из жидкостей культур CHO

Собранную жидкость клеточных культур (HCCF) непосредственно ввели в колонку Blue Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia), уравновешенную в 0,1М фосфата натрия, pH7,4, 0,15М NaCl при соотношении примерно 100л HCCF на литр смолы и при линейной скорости течения около 300мл/ч/см<sup>2</sup>. Затем колонку промыли 3-5 колоночными объемами уравновешивающего буфера, а после этого - 3-5 объемами 0,1М фосфата натрия pH7,4, 2,0М мочевины. Затем TPO элюировали 3-5 колоночными объемами 0,01М фосфата натрия pH7,4, 2,0М мочевины, 1,0М NaCl.

Затем пул, содержащий ТРО, перенесли в колонку Wheat Germ Lectin Sepharose 6MB (Pharmacia), уравновешенную в 0,01М фосфата натрия, pH7,4, 2,0М мочевины и 1,0М NaCl при соотношении от 8 до 16мл пула Blue Sepharose на 1мл смолы и при линейной скорости течения около 50мл/ч/см<sup>2</sup>. Затем колонку промыли 2-3 колоночными объемами уравновешивающего буфера. ТРО элюировали 2-5 колоночными объемами 0,01М фосфата натрия pH7,4, 2,0М мочевины, 0,5М N-ацетил-D-глюкозамина.

Затем пул Wheat Germ Lectin Sepharose довели до концентрации 0,04% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> и 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA). Результирующий пул ввели в колонку обращенно-фазовой хроматографии C4 (Vydac 214NH1022), уравновешенную в 0,1% TFA, 0,04% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> при нагрузке около 0,2-0,5мг белка на мл смолы при линейной скорости течения 157мл/ч/см<sup>2</sup>.

Белок элюировали в двухфазном ацетонитриле с линейным градиентом, содержащем 0,04% C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> и 0,1% TFA. Первая фаза включала линейный градиент ацетонитрила от 0 до 30% за 15 минут. Вторая фаза включала линейный градиент ацетонитрила от 30 до 60% за 60 минут. ТРО элюируется примерно при 50% ацетонитрила. Пул был создан на основе SDS-PAGE.

Пул C4 разбавили 2 объемами 0,01М фосфата натрия, pH7,4, 0,15М NaCl и диафильтровали примерно 6 объемами 0,01М фосфата натрия, pH7,4, 0,15М NaCl на Amicon YM или подобной ультрафильтрационной мембране, фильтрующей молекулярный вес 10000-30000Да. Результирующий диафильтрат можно затем обрабатывать или далее концентрировать ультрафильтрацией. Диафильтрат/концентрат регулируется до конечной концентрации 0,01% Tween-80.

Весь диафильтрат/концентрат или его часть, эквивалентную 2-5% рассчитанного объема колонки вводят в колонку Sephacryl S-300 HR (Pharmacia) уравновешенную в 0,01М фосфата натрия, pH7,4, 0,15М NaCl, 0,01% Tween-80 и хроматографировали при линейной скорости течения около 17мл/ч/см<sup>2</sup>. Фракции, содержащие ТРО, свободные от агрегатов и продуктов протеолитического расщепления, собрали в пул на основе SDS-PAGE. Результирующий пул профильтровали на фильтре 0,22мк, Millex или подобном, и сохранили при 2-8°C.

#### Пример 21

Трансформация и индукция синтеза белка ТРО в E.coli.

##### 1. Конструкция векторов экспрессии ТРО E.coli

Плазмиды pMP21, pMP151, pMP41, pMP57 и pMP202 сконструированы для экспрессии первых 155 аминокислот ТРО вниз от низкомолекулярного лидера, различного в разных конструкциях. Лидеры обеспечивают главным образом высокий уровень иницирования трансляции и быструю очистку. Плазмиды pMP210-1, -T8, -21, -22, -24, -25 сконструированы для экспрессии первых 153 аминокислот ТРО вниз от иницирующего метионина и отличаются только в кодоне для первых 6 аминокислот ТРО-, в то время как плазмид pMP251 является производным от pMP210-1, где С-терминирующий конец ТРО увеличен на 2 аминокислоты. Все вышеупомянутые плазмиды будут продуцировать высокие уровни внутриклеточной экспрессии ТРО в E. coli после индукции триптофанового промотора (Yansura, D. G. et. al. Methods in Enzymology (Goeddel, D. V., Ed.) 185:54-60, Academic Press, San Diego [1990]). Плазмиды pMP1 и pMP172 являются промежуточными среди вышеупомянутых конструкций плазмидов внутриклеточной экспрессии ТРО.

##### (a) Плазмид pMP1

Плазмид pMP1 - вектор секреции для первых 155 аминокислот ТРО, сконструированный путем лигирования вместе 5 фрагментов ДНК, как показано на Фиг.33. Первым из них был вектор pPho21, в котором небольшой фрагмент MluI-BamHI был удален. Вектор pPho21 является производным от pHGH [Chang, C. N. et. al., Gene 55:189-196 (1987)], в котором человеческий ген гормона роста заменен геном phoA E. coli, а участок ограничения MluI переконструирован в кодирующую последовательность для сигнальной последовательности STII аминокислот 20-21.

Еще 2 фрагмента, участок ДНК HinfI-PstI (258 пар оснований) из pRK5-hmpl I (Пример 9), кодирующий аминокислоты 19-103, и следующая синтетическая ДНК, кодирующая аминокислоты 1-18

5' - CGCGTATGCCAGCCGGCTCCTCGCTTGTGACCTCCGAGTCCCTCAGTAAACTGCTTCG TG (послед. №69)

ATACGGTCGGGCCGAGGAGGACGAACACTGGAGGCTCAGGAGTCATTTGACGAAGC ACTGA-5' (послед. №70)

были предварительно лигированы лигазой T4-ДНК, а вторая расщеплена PstI. Четвертым фрагментом был фрагмент PstI-HaeIII (152 пары оснований) из pRK5hmpII, кодирующий аминокислоты 104-155 ТРО. Последним был, фрагмент StuI-BamHI (412 пар оснований) из pdh108, содержащий λ к транскрипционному терминатору, как описано ранее [Scholtissek, S. et. al., NAR 1 5:31 85 (1987)].

##### (b) Плазмид pMP21

Плазмид pMP21 сконструирован для экспрессии первых 155 аминокислот ТРО при помощи лидера из 13 аминокислот, содержащего часть сигнальной последовательности STII. Он был сконструирован путем лигирования вместе трех фрагментов ДНК, как показано на Фиг.34, первый из которых - вектор pVEG31, в котором небольшой фрагмент XbaI-SphI был удален. Вектор VEG31 является производным от pHGH207-1 (de Boer, H. A. et. al., in Promoter Structure and Function [Rodriguez, R. L. and Chamberlain, M. J., Ed, 462, Praeger, New York (1982)] в котором человеческий ген гормона роста заменен геном васкулярного эндотелиального фактора роста (этот идентичный фрагмент вектора может быть получен из последнего указанного плазмиды).

Вторая часть сшивки представляла собой синтетический дуплекс ДНК следующей последовательности:

5' - CTAGAATTATGAAAAAGAAATATCGCATTTCTTCTTAA (послед. №71)

TTAATACTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGAAATGCGC-5' (послед. №72)

Последней частью сшивки был фрагмент MluI-SphI (1072 пар оснований) из pMP1, кодирующий 155 аминокислот ТРО.

##### (c) Plasmid pMP151

Последней частью связки был фрагмент BglI-SphI (1064 пар оснований) из ранее описанного плазмиды pMP11.



#### (h) Плазмид rMP57

Плазмид rMP57 выражает первые 155 аминокислот TPO вниз от лидера, включающего 9 аминокислот сигнальной последовательности STII и диосновный участок Lys-Arg. Этот диосновный участок представляет собой средство удаления лидера при помощи протеазы ArgC. Этот плазмид был сконструирован, как показано на Фиг.41, лигированием вместе трех фрагментов ДНК. Первым из них был ранее описанный вектор pVEG31, в котором небольшой фрагмент XbaI-SphI был удален. Вторым был синтетический дуплекс ДНК:

5' -CTAGAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTAAACGTAGCC, (послед. №83)

TTAATACTTTTTCTTATAGCGTAAAGAAGATTTCAT-5' (послед. №84)

Последней частью связки был фрагмент BglI-SphI (1064 пар оснований) из ранее описанного плазмиды rMP11.

#### (i) Плазмид rMP251

Плазмид rMP251 является производным, от rMP210-1, в котором две дополнительные аминокислоты TPO включены в карбокси-терминирующий конец. Как показано на Фиг.42, этот плазмид был сконструирован путем лигирования вместе двух фрагментов ДНК, один из которых - ранее описанный rMP21, в котором удален небольшой участок XbaI-ApaI, а второй - участок XbaI-ApaI (316 оснований) из rMP210-1.

#### 2. Трансформация и индукция E.coli векторами экспрессии TPO

Вышеупомянутые плазмиды экспресс TPO использовали для трансформации штамма E.coli 44C6 (w3110 tonAΔ proH<sub>ts</sub> lonΔ clpPΔ galE) с использованием метода теплового удара CaCl<sub>2</sub> heat [Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53:159-162, (1970)]. Трансформированные клетки сначала выращивали при 37°C в среде LB, содержащей 50мг/мл карбенициллина, пока оптическая плотность (600nm) культуры не достигла примерно 2-3. Затем культуру LB разбавили в 20 раз в среде M9, содержащей 0,49% казминовых кислот (вес./об.) и 50мг/мл карбенициллина, после выращивания с аэрацией при 30°C в течение часа добавили индол-3-акриловую кислоту до конечной концентрации 50мг/мл. Культуру оставили расти при 30°C с аэрацией на 15 часов, после чего клетки были собраны центрифугированием.

#### Пример 22

Продуцирование биологически активного TPO (Met<sup>1</sup>1-153) в E.coli

Методика, приведенная ниже для продуцирования биологически активного, сложного TPO (Met<sup>1</sup>1-153) может применяться и для извлечения других вариантов TPO, включающих N- и C-терминирующие расширенные формы (см. Пример 23).

#### A. Извлечение нерастворимого TPO (Met<sup>1</sup>1-153)

Клетки E. coli, выражающие TPO (Met<sup>1</sup>1-153), кодируемый плазмидом rMP210-1, ферментируются, как описано выше. Обычно около 100г клеток ресуспендируют в 1л (10 объемов) деструктирующего клеточного буфера (10mM Tris, 5mM EDTA, pH8) с гомогенизатором Polytron, затем центрифугируют клетки при 5000xg в течение 30мин. Промытые гранулы клеток снова ресуспендируют в 1л деструктирующего буфера с гомогенизатором Polytron и пропускают суспензию клеток через устройство клеточной деструкции LH Cell Disrupter (LH Inceltech, Inc.) или через микроразжижитель Microfluidizer (Microfluidics International) в соответствии с инструкциями производителя. Суспензию центрифугируют при 5000g в течение 30мин. и ресуспендируют и центрифугируют второй раз для получения промытого гранулята тел отражения. Промытый гранулят используется сразу или сохраняется замороженным при -70°C.

#### B. Солюбилизация и очистка мономерного TPO (Met<sup>1</sup>1-153)

Вышеупомянутый гранулят ресуспендируется в 5 объемах по весу 20mM Tris, pH8, 6-8M гуанидина и 25mM DTT (дитиотреитол) и перемешивается 1-3 часа, или в течение ночи, при 4°C для солюбилизации белка TPO. Высокие концентрации мочевины (6-8M) также полезны в этом случае, но в конце концов это приводит к снижению выхода по сравнению с гуанидином. После солюбилизации раствор центрифугируют при 30000xg в течение 30мин. для получения чистого супернатанта, содержащего денатурированный мономерный белок TPO. Затем супернатант хроматографируют в гель-фильтрационной колонке Superdex 200 (Pharmacia, 2,6x60cm) при низкой скорости течения 2мл/мин, и элюируют белок 20mM фосфата натрия, pH6,0, с 10mM DTT. Фракции, содержащие мономерный денатурированный белок TPO, элюированные между 160 и 200мл, собрали в пул. Белок TPO подвергли дальнейшей очистке на полупрепаративной обращенно-фазовой колонке C4 (2x20cm VYDAC). Образцы при скорости 5мл/мин. ввели в колонку, уравновешенную в 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) с 30% ацетонитрила. Белок элюировали при линейном градиенте ацетонитрила (30-60% в 60мин.). Очищенный восстановленный белок элюируется примерно при 50% ацетонитрила. Этот материал использовали для укладки с получением биологически активного варианта TPO.

#### C. Генерирование биологически активного TPO (Met<sup>1</sup>1-153)

Около 20мг мономерного, восстановленного и денатурированного белка TPO в 40мл 0,1% TFA/50% ацетонитрила разбавили в 360мл буфера для укладки, оптимально содержащего следующие компоненты:

50mM Tris  
0,3M NaCl  
5mM EDTA  
2% детергента CHAPS  
25% глицерина  
5mM окисленного глутатиона  
1mM восстановленного глутатиона  
pH отрегулирована до 8,3.

После смешивания буфер подвергли легкому перемешиванию при 4°C в течение 12-48 часов для достижения максимального выхода правильно уложенной при помощи дисульфидных связей формы TPO (см. ниже), затем раствор подкислили TFA до конечной концентрации 0,2%, профильтровали через фильтр 0,45

или 0,22 микрон и добавили 1/10 объема ацетонитрила. Этот раствор затем впрыснули непосредственно в колонку C4 и элюировали очищенный, уложенный TPO (Met<sup>1</sup>1-153) по той же программе градиента, что описана выше. В этих условиях сложенный, биологически активный TPO элюируется примерно при 45% ацетонитрила. Неправильно сложенные версии TPO элюируются раньше. Окончательно очищенный TPO (Met<sup>1</sup>1-153) чист более чем на 95%, получаемых при очистке гелями SDS и аналитической обращенно-фазовой хроматографией C4. При исследованиях на животных очищенный материал C4 диализовали в физиологически совместимых буферах. Применялись изотонические буферы (10мМ ацетата натрия, pH5,5, 10мМ сукцината натрия, pH5,5 или 10мМ фосфата натрия, pH7,4), содержащие 150мМ NaCl и 0,01% Tween 80.

Благодаря высокой потенции TPO при анализе Ba/F3 (половина максимальной стимуляции достигается примерно при 3пг/мл) возможно получение биологически активного материала с использованием многих различных буферов, поверхностно-активных веществ и окислительно-восстановительных условий. Однако, в большинстве условий получается лишь малое количество правильно сложенного материала (менее 10%). Для промышленного производства желателен выход как минимум 10%, более предпочтительно 30-50% и наиболее предпочтительно более 50%. Многие различные детергенты (Triton X-100, додецил-бета-мальтозид, CHAPS, CHAPSO, SDS, саркосил, Tween 20 и Tween 80, Zwittergent и другие) применялись в попытке увеличить выход. Из этих детергентов только детергенты семейства CHAPS (CHAPS и CHAPSO) оказались полезными в реакции укладки для лимитирования агрегации белка и образования неправильных дисульфидных связей. Наиболее полезны уровни CHAPS более 1%. Для увеличения выхода требуется хлорид натрия, с оптимальной концентрацией 0,1-0,5М. Присутствие EDTA (1-5мМ) ограничивает количество металл-катализируемого окисления (и агрегации), что наблюдалось в нескольких препаратах. Концентрации глицерина более 15% создают оптимальные условия укладки. Для максимального выхода существенное значение имеет наличие окисленного и восстановленного глутатиона или окисленного и восстановленного цистеина в качестве окислительно-восстановительной реакционной пары. В основном повышенный выход получают при равном или повышенном мольном соотношении окисленного реагента по сравнению с восстановленным. Для укладки данных вариантов TPO является значение pH в диапазоне от 7,5 до 9. Органические растворители (этанол, ацетонитрил, метанол) подходят при концентрациях 10-15% и ниже. Более высокие уровни органических растворителей увеличивают количество неправильно сложенных форм. В качестве буферов в основном применимы Tris и фосфатный. Инкубация при 4°C также способствует повышению уровня правильно сложенного TPO.

Выход 40-60% (от количества восстановленного и денатурированного TPO, используемого в реакции укладки) типичен для препаратов TPO, очищенных на первом этапе хроматографии C4. Активный материал может быть получен из менее чистых препаратов (например, сразу после колонки Superdex 200 или после первоначальной экстракции "тел отражения" тел), хотя выход в этом случае меньше, из-за обширного осаждения и влияния на процесс укладки не-TPO-белков.

Поскольку TPO (Met<sup>1</sup> 1-153) содержит 4 цистеиновых остатка, возможно генерирование трех различных дисульфидных версий этого белка:

- версия 1 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-4 и 2-3
- версия 2 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-2 и 3-4
- версия 3 дисульфидные связи между цистеиновыми остатками 1-3 и 2-4

Во время первых исследований в части определения условий укладки было выделено несколько различных пиков содержания белка TPO при обращенно-фазовой хроматографии C4. Только один из этих пиков обладал значительной биологической активностью, выявленной анализом Ba/F3. В соответствии с этими условиями укладки были оптимизированы для выхода преимущественно этой версии. В этих условиях содержание неправильно сложенных версий составляет менее 10-20% от общего количества мономерного TPO.

Дисульфидной моделью биологически активного TPO оказалась версия 1-4 и 2-3, что определили масс-спектрометрией и секвенированием белка. Равные количества различных пиков C4 (5-10нмоль) расщепляли трипсином (мольное соотношение трипсина к белку -1:25). Расщепленную смесь анализировали масс-спектрометрией лазерной десорбции с матричным усилением до и после восстановления ДТТ. После восстановления были обнаружены массы, соответствующие самым большим триптическим пептидам TPO. В невозстановленных образцах некоторые из этих масс отсутствовали, а появлялись другие массы. Массы новых пиков в основном соответствовали сумме индивидуальных триптических пептидов, входящих в дисульфидную пару. Так, оказалось возможным недвусмысленно обозначить дисульфидную модель сложенного рекомбинантного биологически активного TPO как 1-4 и 2-3. Это согласуется с известной дисульфидной моделью родственной молекулы эритропоэтина.

D. Биологическая активность рекомбинантного сложенного TPO (Met<sup>1</sup>1-153)

Сложенный и очищенный TPO (Met<sup>1</sup>1-153) обладает активностью при анализе, как вне организма, так и в организме. При анализе Ba/F3 половина максимальной стимуляции инкорпорации тимидина в клетки Ba/F3 была достигнута при 3,3пг/мл (0,3пМ). В анализе ELISA на основе mrl-рецептора половина максимальной активности достигнута при 1,9нг/мл (120пМ). У нормальных и миелоугнетенных животных, сублетально облученных рентгеновским излучением, TPO (Met<sup>1</sup>1-153) имел высокую активность (при дозах всего 30нг/мышь), стимулирующую продуцирование новых тромбоцитов.

Пример 23

Продуцирование других биологически активных вариантов TPO в *E. coli*

Различные варианты TPO, продуцируемые в *E. coli*, очищенные и уложенные в биологически активные формы, приведены ниже.

(1) MLF - 13 остатков из бактериально-производной сигнальной последовательности STII сливают с N-конечным доменом TPO (остатки 1-155). Результирующая последовательность выглядит следующим образом:

МККНIAFLNAYASPAPPAC-----CVRRA послед. №85

где последовательность лидера подчеркнута, а C-----C представляет собой цистеины Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>151</sup>. Этот вариант был сконструирован для обеспечения тирозина для радиоактивного йодирования TPO в целях рецепторного и биологического изучения.

(2) H8MLF - 7 остатков из последовательности STII, 8 гистидиновых остатков и последовательность IEGR энзиматического расщепления фактора Ха сливают с N-конечным доменом TPO (остатки 1-155). Результирующая последовательность выглядит следующим образом:

МККНIAFNNNNNNNIEGRSPAPPAC-----CVRRA послед. №86

где последовательность лидера подчеркнута, а C-----C представляет собой цистеины Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>151</sup>. Этот вариант, очищенный и сложенный, может быть обработан энзимом фактора Ха, который производит расщепление после аргининового остатка последовательности IEGR, что дает выход варианта TPO длиной в 155 остатков с природной сериновой N-конечной аминокислотой.

(3) T-H8MLF - получают так же, как описано выше для варианта (2), за исключением того, что тромбин-чувствительная последовательность IEPH сливается с N-конечным доменом TPO. Результирующая последовательность выглядит следующим образом:

МККНIAFNNNNNNNIEPRSPAPPAC-----CVRRA (послед. №87)

где последовательность лидера подчеркнута, а C-----C представляет собой цистеины Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>151</sup>. Этот вариант, очищенный и сложенный, может быть обработан энзимом тромбина для генерирования природного N-конечного варианта TPO длиной в 155 остатков.

A. Извлечение, солюбилизация и очистка мономерных, биологически активных вариантов 91), (2) и (3) TPO.

Все эти варианты были выражены в *E. coli*. Основная часть вариантов была обнаружена в телах отражения, как описано в Примере 22 для TPO (Met<sup>1</sup>-153). Для извлечения, солюбилизации и очистки мономерных вариантов TPO использовали методику, аналогичную описанной в Примере 22. Также использовали аналогичные условия укладки, с получением общего выхода 30-50%. После укладки варианты TPO были очищены обращенно-фазовой хроматографией в 0,1% TFA с использованием ацетонитрильного градиента, как описано ранее. Все варианты TPO (в их непротеолизированной форме) обладали биологической активностью в соответствии с анализом Ba/F3, с достижением половины максимальной активности при 2-5pM.

B. Протеолитическая обработка вариантов (2) и (3) для генерирования аутентичного N-конечного TPO (1-155).

Варианты TPO (2) и (3) были сконструированы с энзиматически-расщепляемым лидирующим пептидом перед обычным N-конечным аминокислотным остатком TPO. После укладки и очистки вариантов (2) и (3), как описано выше, каждый из них подвергли расщеплению соответствующим, энзимом. Для каждого варианта удалили ацетонитрил из этапа обращенно-фазовой хроматографии путем воздействия несильной струей азота на раствор. Затем оба варианта обработали фактором Ха или тромбином, как описано ниже.

Для варианта TPO (2) 1M буфер Tris, pH8, добавили к безацетонитрильному раствору до окончательной концентрации 50mM и отрегулировали pH до 8, если необходимо. Добавили NaCl и CaCl<sub>2</sub> до 0,1M и 2M, соответственно. Добавили фактор Ха (New England Biolabs) до достижения примерно 1:25-1:100 мольного соотношения энзима к варианту. Образец поместили в инкубатор при комнатной температуре на 1-2ч. для получения максимального расщепления, которое оценивается по изменению в миграции в гелях SDS, свидетельствующем о потере последовательности лидера. После этого реакционную смесь очистили обращенно-фазовой хроматографией C4 с использованием того же градиента и тех же условий, что описаны выше для очистки правильно сложенных вариантов. Нерасщепленный вариант B отделили в этих условиях от расщепленного варианта (2). N-конечными аминокислотами оказались SPAPP, показывая, что удаление N-конечной последовательности лидера прошло успешно. Фактор Ха также генерировал различные количества внутренних расщеплений в домене TPO; расщепления наблюдались после аргининового остатка в позиции 118, с получением дополнительной N-конечной последовательности TТАНКDP (номер последовательности: 88). В невозстанавливающих гелях SDS наблюдалась отдельная полоса около 17000 дальтон для расщепленного фактором Ха варианта; в восстанавливающих гелях были видны две полосы с молекулярным весом около 12000 и 5000 дальтон, что согласуется с расщеплением по аргинину 118. Эти наблюдения также подтверждают, что две части молекулы соединены дисульфидной связью между 1-м и 4-м цистеиновыми остатками, как было предположено в результате опытов по триптическому расщеплению, описанных выше. В биологическом анализе Ba/F3 очищенный вариант TPO (1-155), после удаления N-конечной последовательности лидера и с внутренним расщеплением, показал половину максимальной активности 0,2-0,3 пикомоль. Нерасщепленный вариант с последовательностью лидера имел половину максимальной активности 2-4 пикомоль.

Для варианта (3) деструктирующ(ий буфер содержал 50mM Tris, pH8, 2% CHAPS, 0,3M NaCl, 5mM EDTA и человеческий или бычий тромбин (Calbiochem) при соотношении 1:25 - 1:50 вес. энзима к варианту белка TPO. Расщепление проводили при комнатной температуре в течение 2-6ч. Протекание расщепления оценивали при помощи гелей SDS, как описано выше. За это время было достигнуто, в основном, более 90% расщепления последовательности лидера. Результирующий TPO был очищен хроматографией C4, как описано выше, и проверен на наличие нужного N-окончания путем аминокислотного секвенирования. Наблюдались лишь очень малые количества (<5%) внутренних расщеплений в тех же аргинин-треониновых связях, что при расщеплении фактором Ха. Результирующий белок TPO имел высокую биологическую активность с половиной максимального отклика в анализе Ba/F3 при концентрации 0,2-0,4пикомоль. В анализе ELISA на основе рецептора mрI половина максимального отклика наблюдалась при 2-4нг/мл

очищенного белка (120-140 пикомоль), в то время как нерасщепленный вариант, содержащий последовательность лидера, был менее активен в обоих анализах в 5-10 раз. При исследованиях на животных HPLC-очищенный расщепленный белок был диализован в физиологически приемлемом буфере с 150мМ NaCl, 0,01% Tween 80 и 10мМ сукцината натрия, pH5,5, или 10мМ ацетата натрия, pH5,5, или 10мМ фосфата натрия, pH7,4. Полученный после HPLC и SDS очищенный белок был стабилен в течение нескольких недель при хранении при 4°C. У нормальных и миелогенетных мышей этот очищенный ТРО с аутентичной N-конечной последовательностью проявил высокую активность, стимулируя продуцирование тромбоцитов при дозах всего 30нг/мышь.

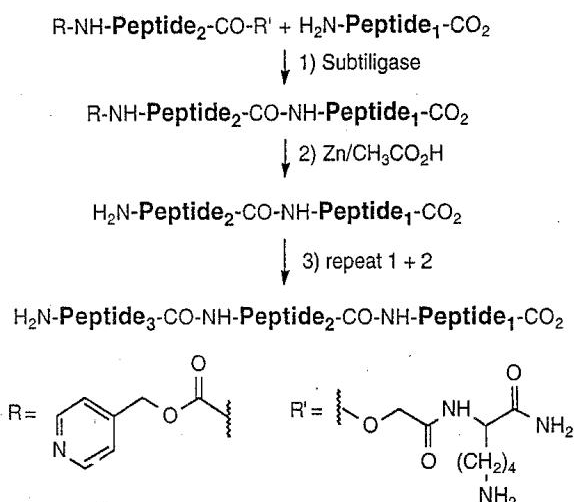
#### Пример 24

##### Синтетический лиганд mrl

Хотя человеческий лиганд mrl (hML) обычно получают методом рекомбинации, его можно также синтезировать путем ферментативного лигирования фрагментов синтетических пептидов, используя методики, описанные ниже. Синтетическое получение hML дает возможность инкорпорации неприродных аминокислот или синтетических функциональных элементов, таких как полиэтиленгликоль. Предварительно был разработан мутант субтилизина BPN протеазы серина, субтилигаза (S221C/P225A), для эффективного лигирования пептидных эфиров в водном растворе [Abrahmsen et al., Biochem., 30:4151-4159 (1991)]. В настоящее время доказано, что синтетические пептиды могут быть ферментатически лигированы в последовательность, образуя ферментически активные длинные пептиды и белки, такие как рибонуклеаза А [Jackson et al., Science, (1994)]. Эта технология, детально описанная ниже, позволила нам химически синтезировать длинные белки, которые раньше могли быть получены только методом рекомбинации ДНК.

Порядок синтеза hML<sub>153</sub> с использованием субтилигазы показан на Схеме 1. После полного снятия защиты молекулы пептида, соответствующего С-конечному фрагменту белка, вместе с субтилигазой добавляют эфирный пептид с защищенным N-окончанием и активированным С-окончанием. По окончании реакции продукт изолируют путем обращенно-фазовой хроматографии HPLC, а защитные группы удаляют из N-окончания. Присоединяют следующий фрагмент пептида, снимают защиту и повторяют этот процесс с использованием подходящих пептидов, пока не будет получен белок полной длины. Этот способ подобен твердофазной методике, в которой пептид с защищенным N-окончанием и активированным С-окончанием лигируется с N-окончанием предыдущего пептида, и белок синтезируется в направлении С-N. Однако поскольку при каждом соединении происходит добавление до 50 остатков, и продукты изолируются после каждой сшивки, то гораздо более длинные высокочистые белки могут быть синтезированы с приемлемым выходом.

Схема 1. Порядок синтеза hML с использованием субтилигазы



На основе наших знаний специфичности субтилигазы, а также аминокислотной последовательности биологически активного "ЕРО-домена" человеческого mrl, мы разделили hML<sub>153</sub> на 7 фрагментов длиной по 18-25 остатков. Были синтезированы испытательные лигирующие тетрапептиды для определения подходящих узлов сшивки в 18-25-мерах. Таблица 13 показывает результаты этих испытательных сшивок.

Таблица 13

#### Испытательные лигирования hML.

Донорные и нуклеофильные пептиды растворили при

10мМ в 100мМ трицина (pH7,8) при 22°C. Добавили лигазу до конечной концентрации

10мкМ из резервного штамма 1,6мг/мл (около 70мкМ), и оставили для протекания лигирования на ночь.

Выход рассчитывали на основе отношения % лигирования к гидролизу донорных пептидов.

Участок	Донор (glc-K-NH <sub>2</sub> )	Нуклеофилы-ЫHr	% гидролиза	% лигирования
1 (23/24)	HVLH (послед. №89)	SRLS (послед. №90)	92	08
(22/23)	SHVL (послед. №91)	HSRL (послед. №92)	48	52
2 (46/47)	AVDF (послед. №93)	SLGE (послед. №94)	22	78

3 (69/70)	AWL (послед. №95)	LLEG (послед. №96)	53	47
4 (89/90)	LSSL (послед. №97)	LGQL (послед. №98)	95	05
(88/89)	C(асм)LSS (послед. №99)	LLGQ (послед. №100)	00	00
(90/91)	SLL (послед. №101)	QLS (послед. №102)	45	55
(88/89)	CLSS (послед. №103)	LLGQ (послед. №100)	90	1
5 (107/108)	LQSL (послед. №104)	LGTQ (послед. №105)	99	01
(106/107)	ALQS (послед. №106)	LLGT (послед. №107)	70	30
6 (128/129)	NAIF (послед. №108)	LSFQ (послед. №109)	60	40

На основе этих экспериментов были сделаны выводы о возможности эффективного лигирования пептидов, представленных в таблице 14, субтилизазой. Возникла необходимость в подходящей защитной группе для N-окончания каждого донорного эфирного пептида, чтобы предотвратить самолигирование. Мы выбрали защитную группу изоникотинила (iNOC) [Veber et al., J. Org. Chem., 42:3286-3289 (1977)], поскольку она водорастворима, может вводиться на последнем этапе твердофазного пептидного синтеза и стабильна к ангидриду HF, используемому для депротекции и расщепления пептидов в твердофазной белковой смоле. Кроме того, ее можно удалить из пептида после каждого лигирования в нестрогих условиях восстановления ( $Zn/CH_3CO_2H$ ) для доступа к свободному N-окончанию для последующих лигирований: Для активации C-окончания использовали гликолят-лизил-амид (glc-K-NH<sub>2</sub>), основываясь на предварительных экспериментах, которые показали, что он эффективно ацилируется субтилизазой [Abrahmsen et al., Biochem., 30:4151-4159 (1991)]. iNOC-защищенные, (glc-K-NH<sub>2</sub>)-активированные пептиды могут синтезироваться стандартным твердофазным методом, как показано на Схеме 2. Затем пептиды последовательно лигируются до получения полного белка, и конечный продукт подвергается укладке вне организма. На основе гомологичности с EPO можно предположить, что дисульфидные пары образуются между цистеиновыми остатками 7 и 151 и между 28 и 85. Окисление дисульфидов можно выполнять просто путем перемешивания восстановленного материала в атмосфере кислорода в течение нескольких часов. Уложенный материал можно очистить при помощи HPLC, и фракции, содержащие активный белок, собрать в пул и лиофилизировать. Как альтернативный вариант, дисульфиды можно защитить различным образом, чтобы регулировать последовательное окисление между специфическими дисульфидными парами. Защита цистеинов 7 и 151 ацетамидометилом (асм) гарантирует окисление цистеинов 28 и 85. Группы асм затем можно удалить и окислить остатки 7 и 151. И наоборот, остатки 28 и 85 можно защитить группами асм и затем окислить, если такое последовательное окисление требуется для правильной укладки. Кроме того, цистеины 28 и 85 могут быть замещены другими природными или искусственными остатками, отличными от цистеина, для гарантии правильного окисления цистеинов 7 и 151.

Таблица 14

Фрагменты пептидов,  
используемые для общего синтеза  
hML с использованием субтилизазы

#### Последовательности фрагментов

##### 1 Последовательность №100

iNOC-HN-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVL-glc-K-NH<sub>2</sub> (1-22)

##### 2. Последовательность №111

iNOC-HN-HSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDF-glc-K-NH<sub>2</sub> (23-46)

##### 3. Последовательность №112

iNOC-HN-SLGEWKTQMEETKAQDILGAVTL-glc-K-NH<sub>2</sub> (47-69)

##### 4. Последовательность №113

iNOC-HN-LLEGVMAARGQLGPTCLSSLL-glc-K-NH<sub>2</sub> (70-90)

##### 5. Последовательность №114

iNOC-HN-GQLSGQVRLLLGALQS-glc-K-NH<sub>2</sub> (90-106)

##### 6. Последовательность №115

iNOC-HN-LLGTQLPPQGRITANKDPNAIF-glc-K-NH<sub>2</sub> (107-128)

##### 7. Последовательность №116

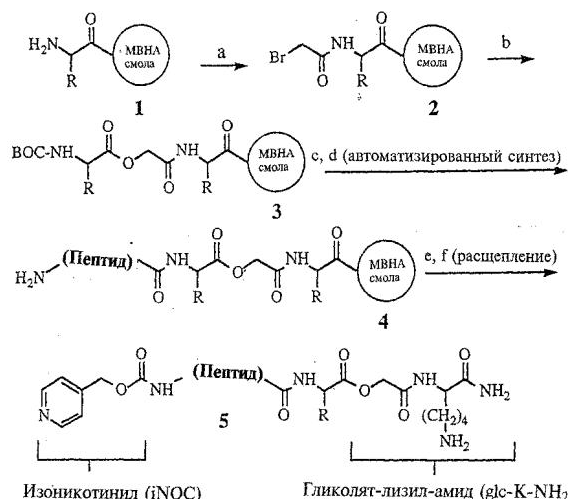
H<sub>2</sub>N-LSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR-CO<sub>2</sub> (129-153)

Лигирование пептидов проводится при 25°C в 100мМ трицине, pH8 (свежеприготовленный и дегазированный путем вакуумной фильтрации через фильтр 5мкм). Обычно C-конечный фрагмент растворяют в буфере (2-5мМ пептид) и добавляют раствор (10х) субтилизазы (1мг/мл в 100мМ трицине, pH8) до конечной концентрации фермента около 5мкМ. 3-5 молярный избыток glc-K-NH<sub>2</sub>-активированного донорного пептида добавляют в виде твердого вещества, растворяют и оставляют смесь стоять при 25°C. За лигированием следят при помощи аналитической обращенно-фазовой C18 HPLC (градиент CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA). Продукты лигирования очищают препаративной HPLC и лиофилизируют. Депротекция изоникотинилом (iNOC) выполняется перемешиванием активированной HCl цинковой пыли с защищенным

пептидом в уксусной кислоте. Цинковая пыль удаляется фильтрацией, а уксусная кислота выпаривается под вакуумом. Результирующий пептид может быть использован непосредственно в следующей сшивке, и процесс повторяется. Синтетический hML<sub>153</sub> может быть лигирован по методике, описанной выше, с синтетическим или рекомбинантным hML<sub>154-332</sub> для получения синтетического или полусинтетического hML полной длины.

Синтетический hML имеет много преимуществ по сравнению с рекомбинантным. В него могут вводиться неприродные боковые цепи с целью улучшения его силы действия или специфичности. Полимерные функциональные элементы, такие как полиэтиленгликоль, могут вводиться для повышения длительности действия. Например, полиэтиленгликоль может быть присоединен к лизиновым остаткам отдельных фрагментов (Таблица 14) до или после одного или нескольких этапов лигирования. Могут быть удалены или видоизменены протеазо-чувствительные пептидные связи для улучшения стабильности в организме. Кроме того, могут быть синтезированы производные тяжелых атомов для содействия в изучении структуры.

Схема 2. Твердофазный синтез фрагментов пептидов для лигирования сегментов



Изоникотинил (iNOC)

Гликолят-лизил-амид (glc-K-NH<sub>2</sub>)

а) Лизил-параметилбензгидриламиновая (МВНА) смола 1 (0,63мжв./г, Advanced ChemTech) перемешивается с бромуксусной кислотой (5экв.) и диизопропилкарбоимидом (5экв.) в течение 1ч. при 25°C в диметилацетамиде (DMA) для получения бромацетильного производного 2. b) Смола промывается большим количеством DMA, а отдельные Boc-защищенные аминокислоты (3экв., Bachem) превращаются в эфиры путем перемешивания с бикарбонатом натрия (6экв.) в диметилформамиде (DMF) в течение 24ч. при 50°C для получения соответствующей гликолят-фенилаланил-амидной смолы 3. Аминоацетилированная смола 3 промывается DMF (3х) и дихлорметаном (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (3х) и может храниться при комнатной температуре несколько месяцев. Затем смолу 3 можно загрузить в автоматизированный пептидный синтезатор (Applied Biosystems 430A), и пептиды удлиняются с использованием стандартной твердофазной методики (5). c) Группа N-p-Boc удаляется раствором 45% трифторуксусной кислоты в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. d) Последовательные Boc-защищенные аминокислоты (5экв.) предварительно активируются с использованием бензотриазол-1-ил-оксис-трис-(диметиламино)-фосфонийгексафторфосфата (BOP6 4экв.) и N-метилморфолина (NMM, 10экв.) в DMA и объединяются на 1-2 часа, e) Последняя N-p-Boc-группа удаляется (TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) для получения 4, а изоникотиниловая (iNOC) защитная группа вводится, как описано ранее (4), путем перемешивания с 4-изоникотинил-2-4-динитрофенилкарбонатом (3экв.) и NMM (6экв.) в DMA при 25°C в течение 24 часов, f) Расщепление и депротекция пептида обработкой ангидридным HF (5% анизол/5% этилметилсульфид) при 0°C в течение 1ч. приводит к получению iNOC-защищенного, гликолят-1ys-амид-активированного пептида 5, который очищается обращенно-фазовой хроматографией C18 HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA). Идентичность всех субстратов подтверждается масс-спектрометрией.

#### Дополнительные правомочия

Заявленное изобретение обладает правомочиями в соответствии с приведенным описанием и имеющимися в наличии справочными и исходными материалами. Тем не менее, Заявители внесли в American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC), следующие клеточные линии:

Escherichia coli i, DH108-pBSK-hmp/ I 1,8, номер поступления в ATCC CRL 69575, вклад 24 февраля 1994.

Plasmid, pSV15.ID.LL.ML0RF, номер поступления в ATCC CRL 7595-8, вклад 2 декабря 1994; и

Клетки CHO DP-12, ML 1/50 MCB (меченые #1594), номер поступления в ATCC accession no. CRL 11770, вклад 6 декабря 1994.

Этот вклад был сделан в соответствии с положениями Будапештского Договора о международном признании вкладов микроорганизмов в целях патентных процедур. Это обеспечивает поддержание жизнеспособности культур в течение 30 лет со дня вклада. Организмы становятся доступными в ATCC в сроки, предусмотренные Будапештским договором, и являются предметом соглашения между Заявителями и ATCC, которое гарантирует их неограниченную доступность после регистрации данного патента U.S. Доступность вложенных штаммов не следует рассматривать как лицензию на практическое использование изобретения в обход патентного законодательства любого правительства.

В то время как описание изобретения, безусловно, включает предпочтительные варианты осуществления и специфические рабочие примеры, средний специалист по прочтении предшествующего описания может вводить различные изменения, эквивалентные замещения и структурные видоизменения предмета изобретения, не отступая от смысла и охватываемой области изобретения. Следовательно, изобретение может быть применено на практике способами, отличными от описанных здесь. Поэтому предполагается, что

защита, обеспечиваемая номером данного патента, ограничивается только приведенными пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

Все справочные материалы приведены здесь в кратком изложении.

Список последовательностей

(1) Общая информация:

(i) Заявитель: Genentech, Inc. Eaton, Dan L. de Sauvage, Frederic J.

(ii) Название изобретения: Тромбопоэтин

(iii) Число последовательностей: 144

(iv) Почтовый адрес:

(A) Адресат: Genentech, Inc.

(B) Улица: 460 Point San Bruno Blvd

(C) Город: South San Francisco

(D) Штат: California

(E) Страна: USA

(F) ZIP 94080

(v) Форма компьютерного считывания:

(A) Тип носителя: флоппи-диск 5,25 дюймов, 360Кб

(B) Компьютер: IBM PC-совместимый

(C) Операционная система: PC-DOS/MS-DOS

(D) Программное обеспечение: patin (Genentech)

(vi) Данные текущей заявки:

(A) Номер заявки:

(B) Дата подачи:

(C) Классификация:

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/176553

(B) Дата подачи: 03-января-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/348657

(B) Дата подачи: 02-декабря-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/185607

(B) Дата подачи: 21-января-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/348658

(B) Дата подачи: 02-декабря-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/196689

(B) Дата подачи: 15-февраля-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/223263

(B) Дата подачи: 04-апреля-1994

(vii) Данные приоритетной заявки:

(A) Номер заявки: 08/249376

(B) Дата подачи: 25-мая-1994

(viii) Информация о поверенном/агенте:

(A) Имя: Винтер, Дэрил Б.

(B) Регистрационный номер: 32637

(C) Ссылка/номер дела: 871P5PCT

(ix) Информация о связи:

(A) Телефон: 415/225-1249

(B) Телефакс: 415/952-9881

(C) Телекс: 910/371-7168

(2) Информация о последовательности №1

(A) Длина: 353 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №1

Met	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Val	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	
1				5				10					15	
Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu
				20				25					30	
Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser
				35				40					45	
Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val
				50				55					60	
Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln
				65				70					75	
Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu
				80				85					90	
Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr
				95				100					105	
Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu
				110				115					120	
Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro
				125				130					135	
Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu
				140				145					150	
Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu
				155				160					165	
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr
				170				175					180	
Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu
				185				190					195	
Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser
				200				205					210	
Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Phe
215				220				225					230	
Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu
				235				240					245	
Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile	His	Gln	Leu	Leu	Asn
				245				250					255	
Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Arg	Thr	Thr	Leu	Gly
				260				265					270	
Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Pro
				275				280					285	
Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	His	Pro	Pro
				290				295					300	
Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	
				305				310					315	
Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro
				320				325					330	
Thr	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	His	
				335				340					345	
Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Gln	Gly							
				350			353							



(2) Информация о последовательности №2

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 1795 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №2

TCCTCCTACC CATCTGCTCC CCAGAGGGCT GCCTGCTGTG CACTTGGGTC 50

CTGGAGCCCT TCTCCACCCG GATAGATTCC TCACCCTTGG CCCGCCTTTG 100

CCCCACCCTA CTCTGCCAG AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC 150

CCCAGGAAGG ATTCAAGGGA GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA 200

GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT 250

TCCTCCTAAT GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGTG 300

ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC 350

AGACTGAGCC AGTGCCACGA GGTTCACCCCT TTGCCTACAC CTGCTCTGCT 400

GCCTGCTGTG GACTTTAGCT TGGGAGAATG GAAAACCCAG ATGGAGGAGA 450

CCAAGGCACA GGACATTCTG GGAGCAGTGA CCCTTCTGCT GGAGGGAGTG 500

ATGGCAGCAC GGGGACAATG GGGACCCACT TGCCTCTCAT CCCTCCTGGG 550

GCAGCTTTCT GGACAGGTCC GTCTCCTCCT TGGGGCCCTG CAGAGCCTCC 600

TTGGAACCCA GCTTCTCCA CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGATCCC 650

AATGCCATCT TCCTGAGCTT CCAACACCTG CTCGAGGAA AGGTGCGTTT 700

CCTGATGCTT GTAGGAGGCT CCACCCTCTG CGTCAGGCGG GCCCAACCA 750

CCACAGCTGT CCCCAGCAGA ACCTCTCTAG TCCTCACAAT GAACGAGCTC 800

CCAAACAGGA CTCTTGGATT GTTGAGACA AACTTCACTG CCTCAGCCAG 850

AACTACTGGC TCTGGGCTTC TGAAGTGGCA GCAGGGATTC AGAGCCAAGA 900

TTCTTGCTCT GCTGAACCAA ACCTCCAGGT CCCTGGACCA AATCCCCGGA 950

TACCTGAACA GGATACACGA ACTCTTGAAT GGAACCTGCT GACTCTTTCC 1000

TGGACCCCTA CGCAGGACCC TAGGAGCCCC GGACATTTCC TCAGGAACAT 1050

CAGACACAGG CTCCTGCGCA CCCAACCTCC AGCCTGGATA TTCTCCTTCC 1100

CCAACCCATC CTCCTACTGG ACAGTATACG CTCTTCCCTC TTCCACCCAC 1150

CTTGCCCAAC CCTGTGGTCC AGCTCCACCC CCTGCTTCCT GACCCCTCTG 1200

CTCCAACGCC CACCCTTACC AGCCCTCTTC TAAACACATC CTACACCCAC 1250

TCCCAGAATC TGTCTCAGGA AGGTAAGGT TCTCAGACAC TGCCGACATC 1300

AGCATTTGCT CATGTACAGC TCCCTTCCCT GCAGGGCGCC CCTGGGAGAC 1350

AACTGGACAA GATTTCTAC TTTCTCTGA AACCCAAAGC CCTGGTAAAA 1400  
GGGATACACA GGACTGAAAA GGGAATCATT TTCTACTGTA CATTATAAAC 1450  
CTTCAGAAGC TATTTTTTTA AGCTATCAGC AATACTCATC AGAGCAGCTA 1500  
GCTCTTTGGT CTATTTTCTG CAGAAATTG CAACTCACTG ATTCTCTACA 1550  
TGCTCTTTT CTGTGATAAC TCTGCAAAGG CCTGGGCTGG CCTGGCAGTT 1600  
GAACAGAGGG AGAGACTAAC CTTGAGTCAG AAAACAGAGA AAGGGTAATT 1650  
TCCTTTGCTT CAAATCAAG GCCTTCCAAC GCCCCCATCC CTTTACTAT 1700  
CATCTCAGT GGGACTCTGA TCCCATATC TTAACAGATC TTTACTCTG 1750

AGAAATGAAT AAGCTTTCTC TCAGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 1795

(2) Информация последовательности №3

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 42 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(ii) Описание последовательности №3

Leu	Leu	Leu	Val	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu
1				5					10					15
Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys
			20					25						30
Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu			
			35					40			42			

(2) Информация о последовательности №4

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 390 оснований

(B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Спиральность: одиночная

(D) Топология: линейная

(ii) Описание последовательности №4

GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT 50

CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT 100

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 150

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 200

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 250

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 300

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 350

CTTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT TCTCTCTCTT 400

(2) Информация о последовательности №5

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 390 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №5

CTTAAGGACC TTATGGTCGA CTGTACTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA 50  
GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA 100  
CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA 150  
GGAGTCATTT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTCT TCTGACCACT 200  
CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AAATAGGCGC ATTGACCATT CTGTGGGTAT 250  
GAGGGTCCTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAACGG GTTACTGATA 300  
AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA 350  
AGAAGTGTTA TGTCGGGCGT AAATTTTCGA GAGCAGATCT 390

(2) Информация о последовательности №6

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 332 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №6

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

Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His  
290 295 300  
Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser  
305 310 315  
Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln  
320 325 330

Glu Gly  
332

(2) Информация о последовательности №7

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 166 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №7

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr  
1 5 10 15  
Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala  
20 25 30  
Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys  
35 40 45  
Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala  
50 55 60  
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu  
65 70 75  
Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro  
80 85 90  
Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu  
95 100 105  
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser  
110 115 120  
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala  
125 130 135  
Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg  
140 145 150  
Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
155 160 165

Arg  
166

(2) Информация о последовательности №8

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 328 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №8

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu
1				5					10					15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro
				20					25					30
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp
				35					40					45
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala
				50					55					60
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met
				65					70					75
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu
				80					85					90
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln
				95					100					105
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro
				110					115					120
Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val
				125					130					135
Arg	Phe	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg
				140					145					150
Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu
				155					160					165
Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr
				170					175					180
Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys
				185					190					195
Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln
				200					205					210
Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Ile
				215					220					225
His	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser
				230					235					240
Arg	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp
				245					250					255
Thr	Gly	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ser
				260					265					270
Pro	Thr	His	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Pro
				275					280					285
Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Pro
				290					295					300
Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Asn
				305					310					315
Thr	Ser	Tyr	Thr	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly		
				320					325					328

(2) Информация о последовательности №9

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 265 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №9

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

(2) Информация о последовательности №10

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 261 аминокислота

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №10

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu
1				5					10					15
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro
				20					25					30
Glu	Val	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp
				35					40					45
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala
				50					55					60
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met
				65					70					75
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu
				80					85					90
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln
				95					100					105
Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro
				110					115					120
Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Asp
				125					130					135
Phe	Trp	Ile	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	His	Cys	Leu	Ser	Gln	Asn	Tyr
				140					145					150
Trp	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Gln	Ser	Gln	Asp
				155					160					165

AIA Pro Pro AIA Ser 120 121  
 TAT AIA Len Pro Ser The NIA Len AIA Pro Cys Gly Pro 122 123  
 TAT AIA Len Pro Ser The NIA Len AIA Pro Cys Gly Pro 124 125  
 AIA TAT IIE The Ser The Pro AIA Pro Ser TAT The Val 126 127  
 The Len AIA AIA IIE AIA NIA AIA Len Pro AIA The Gly Pro 128 129  
 The Len Ser TAT The Len The Gly AIA Ser Pro Gly NIA 130 131  
 AIA IIE Pro Gly AIA AIA The AIA The Len Gly TAT AIA Ser TAT 132 133  
 Ser TAT Ser AIA Gly Pro AIA Len AIA Val Pro Gly Pro AIA Pro 134 135

(2) Информация о последовательности №11

- (i) Характеристика последовательности:
  - (A) Длина: 7849 оснований
  - (B) Тип: нуклеиновая кислота
  - (C) Спиральность: одиночная
  - (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №11

CCCAGCCTCC TTCTCTTGT TCCCTGGTCA TGCCTGCCTC CCTGTCTCCT 50  
 GTCTCTCCCT CCCACACACA CCCACTATCC TCCCAGCTAT CCCTACACCC 100  
 TCCTTCCTAA TCTTGGGAGA CATCTCGTCT GGCTGGACGG GAAAATTCCA 150  
 GGATCTAGGC CACACTTCTC AGCAGACATG CCCATCCTTG GGGAGGAGGA 200  
 ACAGGAGAGA GCCTGAGGAA GTTCTGGGGG ACAGGGGGAT GATGGGATCA 250  
 AGGTCAGGCC AGGAAGCCCC TGAGGACAGA GACTGTGGGG AGACTGGGAC 300  
 TGGAAGAAA GCAAAGGAGC TAGAGCCAGG GCCAAAGGAA AAGGGGGGCC 350  
 AGCAGGGAGG TATTTGCGGG GGAGGTCCAG CAGCTGTCTT TCCTAAGACA 400  
 GGGACACATG GGCTGGTTA TTCCTCTTGT CACATGTGGA ACGGTAGGAG 450  
 ATGGAAGACG GAGACAGAAC AAGCAAAGGA GGGCCCTGGG CACAGAGGTC 500

022 GAATTCACCA CAGACACACC CAGGTCACC GAACOTACCA ATGTGTGTGT  
003 TCCACGCCCC GTGTACATAC ACCGCTGTGT ACCTDACCJA ATTCCGACTC  
023 ATACCCACCA ACAATACCCC TTTCCTAAAC GTCCCTAACCT GACGTACAG  
004 GGAAGGCTTC ACCCTGTGTG CTATAACGCG TGTACTCTCT TTAGAGGACA  
024 AGGACGAAAA GAAAGACATT AGCGGATCCC TCAGGATAGA ACAGTAAGCG  
005 AAAAGGACCC TGTAGTATCG ACACGACTTT TAGGTTGTCC TACGAAAGAA  
025 CCAAGACAAA TTCTAACGAC CGCAAAAGTG AGGACCGGAT AGGTTTAAAG  
006 AGGTCGTCTT TAGAGCGCTC GTAAAGACA AGGACCGCTT GTTCTGTGT  
026 ACCGTGACCC GTTGGACCGT GGAAGTCCC GTGTGTCTCT GTTCAAAAAA  
007 GTGGGTGTGT GTGGTCCCTC TTCTAAACCT ATCCCTCTAG GTAGAAAAAG  
027 ACTCGGGAAG AGAAGGACCC TCGGGGACCG ACCGTGTCTC AGGTGAGGAG  
008 ACGGGTTAGT CTCTTCTCTC GTGTGTCTCT GACGACTTCC GGGGGCTTC  
028 CCGGTGTCTC GAGGTGTCTC TGTCTCACTA TCGGACGGA CCGGTGAAAG  
009 GTCTCTCTCT GGGAGACCCC TGTCTACCC ATCTTCTGT ACACCGCCAG  
029 TGGGACGACC GGTGAGTGGC CCACTCTCTC CGGAGGTCTT GGGTTTACGT  
010 GACCTTCTCG TAAAGADAAA CACACGAAA GATGGGAGTG TATTGGGTTG  
030 AGGTCTTTTC AGTACCGGAC ATCGAAGGTC AAAAGGACCG GAGGGGGGTC  
011 GATGGGACCG AGACGGGACG AGGAGGCTAA GACCTTCTCC ATGTGAGAAAG  
031 GATAAGGTGG TTCAATTCACT AGTACGGGAG TCTTTGCTCG TGGGTGCGGG  
021 AAGAGGACCC GAGGTACAGG GGAAGGGAAT CCGGTCTGGT CCGGACACGA



0281 GTAAATGAT GACACAAACG ATTCCGCAAT CACCTCGAGG GAGAGATTA  
0091 GAATTTGATTT GGTCTTACTT GGTGATTTCT TACCTCTAAC CCGGACACAG  
0291 GAACCGCGGA CCGAACCGAC CGGCTCGAAG GGTCTGTGAT GTAAATCTTT  
0011 AAAGGACATG GAGACATTTG TACTGACCGG GAGGAGGAT AATCGGAGAG  
0211 GAGGAAAGTG TTCAACACGT TTCTCGGAGG GTGAGCTAAG TTATAACCGT  
0091 ACCCTCTTGG GGAAGCGAA GGAATGTCTG TCGGCGGTGT ACCGAGGAG  
0291 CGCGGTGATTT GTATAGACAG ATATCTGAGT GTGAGCGGAG GAGCGCGGGA  
0091 TCGCGGTGGA CGACCGACCTA CGGCTGGAAT CCGCGAATGG AACAGATTCG  
0291 TCTACCGGAT TGTAAAGAGG TGAAGGAGG GAGTCTGTGT GAGCGGTCTT  
0091 GAAAGAGAAA CCGGAGGCTG AGGCTTTAT GAGCTAATAG ATCTCGGCTG  
0291 TTAACTGAGG ATAGAGAGG GATAGATGCG GTGTGTATTT TCGGTGAGCT  
0011 TCGGATTTGA CCGTGTGAT CTGAGTCTT AATTTTCTGG GATACCTCTT  
0211 TCGGATTTGA AGACCGGAGG CCGACCGCGG ACCGCTCTCGG TTGAGCTTT  
0011 TACCTGAGGT CCGGACCGGA CTCTCTGAGG GTTCTCTCGG GTTATAGAG  
0211 CGTATCTCTT CCGTTGATAA GAGCGAAGTG GAGCTCTCTT TCTGAGCTTT  
0011 GAATTTAAGA CTCTGTGAGG CGAGGAGTG AGTCTCTTTT AGCGCTAGCG  
0211 GAGGAGCTCT GTGCTCTGT AGTATAGATA TGTGTGTATA GAATTAATCG  
0011 AAAGAGTCTT GAGGAGTCTT TTAGCTCTGT CCGAAGCGAG GGTGAGGAGG  
0211 TTTTCTCTTT TTTCTTTCTT TCTCTCTCTT TTTCTGATAG GAGAGAGGAA  
0011 GTAGGAGAG GTGAGCGCGG TTATCTGAG TTTGAGGAG AGTTTTTTTT  
0211 GTTAGGAGAG ATGAGCGCGG CCGCTCGAAA GAGGAGCTCG CCGGAGCGTG

TCCTGTCTCA GCCTCCCAAG TAGCTTGGAT TACAGGCATG AGCCACCACA 2600  
CCCTGCTAGT TTTTGTGTAT TTCGTAGAGC CGGGGTTTCA CCATGTTAGT 2650  
GAGGCTGGTG GCGAACTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTTGGACTC 2700  
CCAAAGTGCT GGGATTACAG GCATGAGCCA CTGCACCCGG CACACCATAT 2750  
GCTTTCATCA CAAGAAAATG TGAGAGAATT CAGGGCTTTG GCAGTTCCAG 2800  
GCTGCTCAGC ATCTCAAGCC CTCCCCAGCA TCTGTTTACC CTGCCAGGCA 2850  
GTCTCTTCCT AGAAACTTGG TTAAATGTTT ACTCTTCTTG CTACTTTCAG 2900  
GATAGATTCC TCACCTTTGG CCCGCCCTTG CCCCACCCCTA CTCTGCCCAG 2950  
AAGTGCAAGA GCCTAAGCCG CCTCCATGGC CCCAGGAAGG ATTCAGGGGA 3000  
GAGGCCCCAA ACAGGGAGCC ACGCCAGCCA GACACCCCGG CCAGAATGCA 3050  
GCTGACTGGT GAGAACACAC CTGAGGGGCT AGGGCCATAT GGAACATGA 3100  
CAGAAGGGGA GAGAGAAAGG AGACACGCTG CAGGGGGCAG GAAGCTGGGG 3150  
GAACCCATTC TCCCAAAAAT AAGGGGTCTG AGGGGTGGAT TCCCTGGGTT 3200  
TCAGGTCTGG GTCCTGAATG GGAATTCCTG GAATACCAGC TGACAATGAT 3250  
TTCCTCCTCA TCTTCAACC TCACCTCTCC TCATCTAAGA ATTGCTCCTC 3300  
GTGGTCATGC TTCTCCTAAC TGCAAGGCTA ACGCTGTCCA GCCCGGCTCC 3350  
TCCTGCTTGT GACCTCCGAG TCCTCAGTAA ACTGCTTCGT GACTCCCATG 3400  
TCCTTCACAG CAGACTGGTG AGAACTCCCA ACATTATCCC CTTTATCCGC 3450  
GTAACCTGTA AGACACCCAT ACTCCAGGA AGACACCATC ACTTCCTCTA 3500  
ACTCCTTGAC CCAATGACTA TTCCTCCCAT ATTGTCCCA CCTACTGATC 3550

008E 00AAAAATTTA 00000000AT AACACCTTCTT ATTAAAGACA GTTCTCTACA  
008E 0AT000ATTA TTCTCT000AT 0AG0A00TAC T0AT0ATAGA 0ATCT0TCT  
007E AACCTTTTCTT AACCA00000 0TCTT000T0 0ACCTTATCTT 0TCT00ATAC  
007E 000T00T0T 0T00ACAT00 0TTT000AT T00A0A0000 T0A000A0A0  
008E 00AAA0AAT0 0TADAC00AA AAC0TA0A00 00TT00ATTT 0A00T0T0T  
008E TT00T0A000 TTT0ACCTTCT 0T00T0AAT0 0TCT000TT0 0AAT000TAC  
008E A0TT00A0T0 TATAAAAAAT TTT00A0TT0 TTACAA00T0 TTAB0TAC00  
008E 00T0T000AT A0T0ATAT00 A0T0ACAT0T AAC00AAT00 0AC000TT00  
0000 0A0T00A00 TTTA0ATAA0 T0TATA00T 00AC0TT000 TABTADAATA  
0200 T0AT00A0TT T00TAC0000 TACT000TAA A0A0A00T00 AAAA0TAC0A  
0010 TACT0TATAC T0A0A000AA 0A0TAC00T TAAATTTCT0 T0AC0T0T00  
0210 A0T0A0AAAA 0AATAAAAA0 A0CAT0A000 0T00AAAA00 A0T0A0A00  
0050 0AACAAAA0T0 0AACAAAAA0 T00AT0A0AA A0T0A0TAAA 0TTA0A00TA  
0050 A000TAAAT0T 000AC0T000 00000000T0 TACATCTTTCA AATATADADA  
00E0 0A0TTT0A00 A000A0T00 A0TADAC00A 000A00000A 000TTT0A00  
02E0 TAAAA0ATAA 0AAT0AT0T0 T00000AAAA 000TACAA00 00T000A00A  
0000 0T000A000T T0AT00A000 TAA0T000T A00T0AT00T A0000000AT  
0200 0A0T00A0T0 A0T0T00A00 T00A00A000 A00TT000TA A0A00A00AA  
0020 A0T0T000T0 AAAA00A0AA 0A0T000T00 0AC0T0A00T AAC00TACTA  
0220 0TTATCTTDA AAT0A0TAA0 TAAAT0T0TA 0AT0TTAAAA AAAA0A0AAA

CAGCTTTCAG GCCACAATGC CCTGCTTCCA TCATTTAAGC CTCTGGCCCT 4600  
AGCACTTCCT ACGAAAAGGA TCTGAGAGAA TTAAATTGCC CCCAACTTA 4650  
CCATGTAACA TTA CTGAAGC TGCTATTCTT AAAGCTAGTA ATTCTTGTCT 4700  
GTTTGATGTT TAGCATCCCC ATTGTGGAAA TGCTCGTACA GAACTCTATT 4750  
CCGAGTGGAC TACACTTAAA TATACTGGCC TGAACACCGG ACATCCCCCT 4800  
GAAGACATAT GCTAATTTAT TAAGAGGGAC CATATTAAAC TAACATGTGT 4850  
CTAGAAAGCA GCAGCCTGAA CAGAAAGAGA CTAGAAGCAT GTTTTATGGG 4900  
CAATAGTTTA AAAAATAAA ATCTATCCTC AAGAACCCTA GCGTCCCTTC 4950  
TTCCTTCAGG ACTGAGTCAG GGAAGAAGGG CAGTTCCTAT GGGTCCCTTC 5000  
TAGTCCTTTC TTTTCATCCT TATGATCATT ATGGTAGAGT CTCATACCTA 5050  
CATTTAGTTT ATTATATTAT ATTATTTGAG ACGGAGTCTC ACTCTATCCC 5100  
CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ATGATCTCAA CTCACTGCAA CCTCAGCCTC 5150  
CCGGATTCAA GCGATTCTCC TGCCTCAGTC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC 5200  
AGGTGCCCAC CACCATGCCC AGCTAATTTT TGTATTTTGT GTAGAGATGG 5250  
GGTTTCACCA TGTGGCCAG GCTGATCTTG AACTCCTGAC CTCAGGTGAT 5300  
CCACCTGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACTG 5350  
CACCCAGCCT TCATTCACTT TAAAAATCAA ATGATCCTAA GGTTTTGAG 5400  
CAGAAAGAGT AAATTGAGC CACTAGAACC AAGAGGTAAA AGCTGTAACA 5450  
GGGCAGATTT CAGCAACGTA AGAAAAAGG AGCTCTTCTC ACTGAAACCA 5500  
AGTGTAAAGC CAGGCTGGAC TAGAGGACAC GGGAGTTTTT GAAGCAGAGG 5550  
CTGATGACCA GCTGTCGGGA GACTGTGAAG GAATTCCTGC CCTGGGTGGG 5600

ACCTTGGTCC TGTCCAGTTC TCAGCCTGTA TGATTCACTC TGCTGGCTAC 5650  
TCCTAAGGCT CCCACCCGC TTTTAGTGTG CCCTTGAGG CAGTGCCTT 5700  
CTCTCTTCCA TCTCTTCTC AGGAGGAGAC CAAGGCACAG GACATTCTGG 5750  
GAGCAGTGAC CCTTCTGCTG GAGGGAGTGA TGGCAGCAG GGGACAACCT 5800  
GGACCCACTT GCCTCTCATC CCTCCTGGGG CAGCTTTCTG GACAGGTCCG 5850  
TCTCCTCCTT GGGGCCCTGC AGAGCCTCCT TGGAAACCAG GTAAGTCCCC 5900  
AGTCAAGGGA TCTGTAGAAA CTGTTCTTTT CTGACTCAGT CCCACTAGAA 5950  
GACCTGAGGG AAGAAGGGCT CTTCAGGGA GCTCAAGGGC AGAAGAGCTG 6000  
ATCTACTAAG AGTGCTCCCT GCCAGCCACA ATGCCTGGGT ACTGGCATCC 6050  
TGTCTTTTCT ACTTAGACAA GGGAGGCCTG AGATCTGGCC CTGGTGTTTG 6100  
GCCTCAGGAC CATCCTCTGC CCTCAGCTTC CTCCACAGGG CAGGACCACA 6150  
GCTCACAAGG ATCCCAATGC CATCTTCCTG AGTTTCCAAC ACCTGCTCCG 6200  
AGGAAAGGTG CGTTTCCTGA TGCTTGTAGG AGGTCCACC CTCTGCGTCA 6250  
GGCGGGCCCC ACCCACCACA GCTGTCCCCA GCAGAACCTC TCTAGTCCCTC 6300  
ACACTGAACG AGCTCCCAA CAGGACTTCT GGATTGTTGG AGACAAACTT 6350  
CACTGCCTCA GCCAGAACTA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG TGGCAGCAGG 6400  
GATTCAAGAG CAAGATTCTT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGSTCCCTG 6450  
GACCAAAATC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC 6500  
TCGTGGACTC TTTCCTGGAC CCTCAGCAG GACCCTAGGA GCGCCGACA 6550  
TTTCCTCAGG AACATCAGAC ACAGGCTCCC TGCCACCAA CCTCCAGCCT 6600

GGATATTCTC CTCCCCAAC CCATCCTCCT ACTGGACAGT ATACGCTCTT 6650  
CCCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCCTGT GGTCCAGCTC CACCCCTGCG 6700  
TTCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC 6750  
ACATCCTACA CCCACTCCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AAGGTTCTCA 6800  
GACACTGCCG ACATCAGCAT TGTCTCATGT ACAGCTCCCT TCCCTGCAGG 6850  
GCGCCCTGG GAGACAACTG GACAAGATT CCTACTTTCT CTGAAACCC 6900  
AAAGCCCTGG TAAAAGGGAT ACACAGGACT GAAAAGGGAA TCATTTTCA 6950  
CTGTACATTA TAAACCTCA GAAGCTATTT TTTTAAGCTA TCAGCAATAC 7000  
TCATCAGAGC AGCTAGCTCT TTGCTCTATT TTCTGCAGAA ATTTGCAACT 7050  
CACTGATTCT CTACATGCTC TTTTCTGTG ATAACTCTGC AAAGCCCTGG 7100  
GCTGGCCTGG CAGTTGAACA GAGGAGAGA CTAACCTGA GTCAGAAAC 7150  
AGAGAAAGGG TAATTTCTT TGCTTCAAT TCAAGCCTT CCAACGCCCC 7200  
CATCCCTTT ACTATCATT TCAGTGGAC TCTGATCCA TATTCTTAA 7250  
AGATCTTTAC TCTTGAGAA TGAATAAGCT TTCTCTCAGA AATGCTGTCC 7300  
CTATACACTA GACAAACTG AGCCTGTATA AGGAATAAT GGGAGCGCCG 7350  
AAAAGCTCCC TAAAAGCAA GGGAAAGATG TTCTTCGAGG GTGGCAATAG 7400  
ATCCCTCTCA CCCTGCCACC CCAACAAAA AAGCTAACAG GAAGCCTTGG 7450  
AGAGCCTCAC ACCCCAGGTA AGGCTGTGTA GACAGTTCAG TAAAGACAGG 7500  
ACCTGGATGT GACAGCTGAG CAAACAGCTA GAGCTTTGGC AGCTCAGCAG 7550  
GAGGCTTTGC CAGGCATGGA CGCCTGCCTC CCTCTGTGG AGGTGAGGAG 7600  
0297 AGGAGAGAG AGTCTAGTTC CTGAGCTGA ATACCTGAA GAGCTGAG  
0077 GGGCTTGGG GGTTCATTCG GAATTTGAG ATGAACTGA CATGAGAG  
0277 GGGATCTGT TAAATAGAG CATCTGTCTT GAGGAAAAA TCTACTTAA  
0087 GGGCTGAG TAAAGCTTC GGGTATTC GAGTGAAGA AAATCTTAG  
0287 GGTGCTG GAAAGAAAA GAGTTGTCT TGGAAAAA ATCTGTCTT

(2) Информация о последовательности №12

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 1443 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №12

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50  
AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAAGG GAGAGGCCCC 100  
ATACAGGAG CCACTTCAGT TAGACACCCT GGCCAGAATG GAGCTGACTG 150  
ATTTGCTCCT GCGGGCCATG TTCTTTCAG TGGCAAGACT AACTCTGTCC 200  
AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCCAAG CTCCTAAATA AACTGCTGCG 250  
TGACTCCAC CTCCTTCACA GCGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTCGACC 300  
CTTTGTCTAT CCCTGTCTTG CTGCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA 350  
TGGAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGAGT 400  
GTCCCTCTA TTGGAGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCT 450  
CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC 500  
TTGGGGCCC TGACGGCCT CTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA 550  
CAAGGACCCC AATCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAATG CTTCGGGAA 600  
AGGTGCGCTT CTGCTTCTG GTAGAAGTC CCACCTCTG TGTACAGCG 650  
ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCAGCT 700  
AACAAGTTC CCAACAGGA CTCTGGATT GTTGAGACG AACTTCAGT 750  
TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTC 800  
AGAGTCAAGA TTAATCCTGG TCAGTAAAT CAAACCTCCA GGTCCCCAGT 850  
CCAAATCTCT GGATACCTGA ACAGGACACA CGGACCTGTG AATGGAATC 900  
ATGGGCTCTT TGCTGAACC TCACTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC 950  
TCGCCCCGAG TTTCACAAA AGGCTCCCTG GCATTCAACC TCCAGGGTGG 1000  
ACTTCTCTT TCTCAAGCC TTGCTCTGA TGGACACACA CCCTTCCCTC 1050  
CTTCACCTGC CTGCCCCACC ACCATGGAT CTCACCCCA GCTCCACCCC 1100  
CTGTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AACTCTACCG CCCCTCATCC 1150  
AGTCACAATG TACCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG 1200  
GGCACTGACC CAGTGAAGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC 1250  
AGGAAGGCTG AGAGGAGCT GCATCTGCTC CAGATGTTCT GCTTTCACCT 1300  
AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG 1350  
GAGCTATTTT TTTTAACTT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA 1400  
TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTGAA AATCATAAT TCT 1443

(2) Информация о последовательности №13

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 352 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(ii) ÖNTERBUNG NÖCHERSTENSTEN (11)

Met Gln Leu Thr Asp Leu Leu Ala Met Leu Ala Val  
1 10 12

Ala Asp Leu Thr Ser Pro Val Ala Pro Ala Cys Asp Pro  
10 12 13

Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Asp Ser His Leu His Ser  
12 13 14

Arg Leu Ser Gln Cys Pro Asp Val Asp Pro Leu Ser Ile Pro Val  
13 14 15

Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gln Trp Lys Thr Gln  
14 15 16

Thr Gln Gln Ser Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gln Ala Val Ser Leu  
15 16 17

Leu Leu Gln Gln Val Met Ala Ala Arg Gln Leu Gln Pro Ser  
16 17 18

Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gln Leu Ser Gln Val Arg Leu  
17 18 19

Leu Leu Gln Ala Leu Gln Leu Gln Thr Gln Gln Arg Thr  
18 19 20

Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Leu Phe Ser Leu Gln Gln  
19 20 21

Leu Leu Arg Gln Lys Val Arg Phe Leu Leu Val Gln Gln Pro  
20 21 22

Thr Leu Cys Val Arg Thr Leu Pro Thr Ala Val Pro Ser  
21 22 23

Ser Thr Ser Gln Leu Leu Thr Leu Asn Lys Phe Pro Asn Arg Thr  
22 23 24

Ser Gln Leu Leu Gln Thr Asn Phe Ser Val Thr Ala Arg Thr Ala  
23 24 25

Gln Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gln Gln Phe Arg Val Lys Ile  
24 25 26

Thr Pro Gln Gln Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Pro Val Gln Ile  
25 26 27

Ser Gln Tyr Leu Asn Arg Thr His Gln Pro Val Asn Gln Thr His  
26 27 28

Gln Leu Phe Ala Gln Thr Ser Leu Gln Thr Leu Gln Ala Ser Asp  
27 28 29

Ile Ser Pro Gln Ala Phe Asn Lys Gln Ser Leu Ala Phe Asn Leu  
28 29 30

Gln Gln Gln Leu Pro Ser Pro Ser Pro Ala Pro Thr Thr His Gly Ser  
29 30 31

Thr Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ala Leu Pro Thr Thr His Gly Ser  
305 310 315

Pro Pro Gln Leu His Pro Leu Phe Pro Asp Pro Ser Thr Thr Met  
320 325 330

Pro Asn Ser Thr Ala Pro His Pro Val Thr Met Tyr Pro His Pro  
335 340 345

Arg Asn Leu Ser Gln Glu Thr  
350 352



(2) Информация о последовательности №14

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 1356 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №14

GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG 50

AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAAGG GAGAGGCCCC 100

ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCTT GCCAGAATG GAGCTGACTG 150

ATTTGCTCCT GCGGGCCATG CTCTTTGCAG TGGCAAGACT AACTCTGTCC 200

AGCCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCAGA CTCCTAAATA AACTGCTGCG 250

TGACTCCAC CTCCTTCACA GCCACTGAG TCAGTGTCCC GACGTCGACC 300

CTTTGTCTAT CCTGTCTTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA 350

TGGAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT 400

GTCCCTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCTT 450

CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCCTC 500

TTGGGGGCCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CAGCTTCCTC TACAGGGCAG 550

GACCACAGCT CACAAGGACC CCAATGCCCT CTCTTGAGC TTGCAACAAC 600

TGCTTCGGGG AAAGGTGCGC TTCTGTCTT TGGTAGAAGG TCCCACCTC 650

TGTGTAGAC GGACCTGCTC AACCACAGCT GTCCCAAGCA GTAATCTCA 700

ACTCTCACA CTAACAAGT TCCCAACAG GACTTCTGGA TTGTTGGAGA 750

CGAATTCAG TGTCACAGCC AGAAGTCTG GCCCTGGACT TCTGAGCAGG 800

CTTCAGGGAT TCAGAGTCAA GATTACTCCT GGTCACTAA ATCAAACCTC 850

CAGGTCCCA GTCCAAATCT CTGGATACCT GAACAGGACA CACGGACCTG 900

TGAATGGAAC TCATGGGCTC TTTGCTGGA CCTCACTCA GACCTGGAA 950

GCCTCAGACA TCTCGCCCG AGCTTTCAAC AAAGGCTCCC TGGCATTCAA 1000

CCTCCAGGGT GGAATTCCTC CTTCTCCAAG CCTGTCTCCT GATGGACACA 1050

CACCTTCCC TCCTTCACCT GCCTTGCCCA CCACCATGG ATCTCCACCC 1100

CAGCTCCACC CCCTGTTTCC TGACCTTCC ACCACCATGC CTAATCTAC 1150

CGCCCTCAT CAGTCACAA TGATCCCTCA TCCCAGGAAT TTGTCTCAGG 1200

AAACATAGCG CGGGCACTGG CCCAGTGAGC GTCTGCAGCT TCTCTCGGG 1250

ACAAGCTTCC CCAGGAAGGC TGAGAGGCAG CTGCATCTGC TCCAGATGTT 1300

CTGCTTTCAC CTAAGAGGCC CTGGGAAGG GATACACAGC ACTGGAGATT 1350

GTAAATTTT AGGAGCTATT TTTTAAAC CTATCAGCAA TATTCATCAG 1400

AGCAGCTAGC GATCTTTGGT CTATTTTCG TATAAATTG AAAATCACTA 1450

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1500

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1536

(2) Информация о последовательности №15

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 356 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №15

Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Ala	Val
1				5					10					15
Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Asp	Pro
				20					25					30
Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Leu	His	Ser
				35					40					45
Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val
				50					55					60
Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln
				65					70					75
Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu
				80					85					90
Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser
				95					100					105
Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu
				110					115					120
Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu
				125					130					135
Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu
				140					145					150
Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Leu	Leu
				155					160					165
Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr
				170					175					180
Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe
				185					190					195
Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr
				200					205					210
Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe
				215					220					225
Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser
				230					235					240
Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val
				245					250					255
Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu
				260					265					270
Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu
				275					280					285
Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala
				290					295					300
Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr
				305					310					315
Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro
				320					325					330
Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	His	Pro	Val	Thr	Met
				335					340					345
Tyr	Pro	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr				
				350					355	356				

(i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 241 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

[illegible]

(i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 335 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

Ser	Pro	Val	Ala		Pro	Ala	Cys	Asp		Pro	Arg	Leu	Leu	Lys	Leu	15
1				5						10						
Leu	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro		30
				20					25							
Asp	Val	Asp	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp		45
				35					40							
Phe	Ser	Leu	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Ser	Lys	Ala		60
				50					55							
Gln	Asp	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met		75
				65					70							
Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Pro	Ser	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu		90
				80					85							
Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln		105
				95					100							
Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala		120
				110					115							
His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu		135
				125					130							
Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Heu	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu		150
				140					145							
Cys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Thr		165
				155					160							
Ser	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Pro	Asn	Arg	Thr	Ser	Gly		180
				170					175							
Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro		195
				185					190							
Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Pro		210
				200					205							
Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Ile	Ser	Gly		225
				215					220							
Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	His	Gly	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Leu		240
				230					235							
Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Ile	Ser		255
				245					250							
Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly		270
				260					265							
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Asp	Gly	His	Thr	Pro		285
				275					280							
Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Thr	His	Gly	Ser	Pro	Pro		300
				290					295							
Gln	Leu	His	Pro	Leu	Phe	Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr	Met	Pro	Asn		315
				305												

(2) Информация о последовательности №18

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 332 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №18

```
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu
1      5      10      15
Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Gly Arg Leu Ser Gln Cys Pro
20      25      30
Asp Ile Asn Pro Leu Ser Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp
35      40      45
Phe Thr Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Thr Glu Gln Thr Lys Ala
50      55      60
Gln Asp Val Leu Gly Ala Thr Thr Leu Leu Leu Glu Ala Val Met
65      70      75
Thr Ala Arg Gly Gln Val Gly Pro Pro Cys Leu Ser Ser Leu Leu
80      85      90
Val Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln
95      100     105
Asp Leu Leu Gly Met Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala
110     115     120
His Lys Asp Pro Ser Ala Ile Phe Leu Asn Phe Gln Gln Leu Leu
125     130     135
Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Leu Leu Val Val Gly Pro Ser Leu
140     145     150
Cys Ala Lys Arg Ala Pro Pro Ala Ile Ala Val Pro Ser Ser Thr
155     160     165
Ser Pro Phe His Thr Leu Asn Lys Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly
170     175     180
Leu Leu Glu Thr Asn Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser
185     190     195
Gly Phe Leu Lys Arg Leu Gln Ala Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly
200     205     210
Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly His
215     220     225
Gln Asn Gly Thr His Gly Pro Leu Ser Gly Ile His Gly Leu Phe
230     235     240
Pro Gly Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gly Ala Pro Asp Ile Pro Pro
245     250     255
Ala Thr Ser Gly Met Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly
260     265     270
Glu Ser Pro Ser Pro Ala His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu
275     280     285
Phe Ser Pro Ser Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln Leu Gln
290     295     300
Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro Asn Ser Thr Ser
305     310     315
Pro Leu Leu Phe Ala Ala His Pro His Phe Gln Asn Leu Ser Gln
320     325     330
Glu Glu
332
```

(2) Информация о последовательности №19

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 1026 оснований

(B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Спиральность: одиночная

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №19

AGCCCGGCTC CTCCTGCCTG TGACCCCGCA CTCCTAATA AACTGCTTCG 50  
TGACTCCCAT GTCCCTCAGC GCAGACTGAG CCAGTGCCCA GACATTAACC 100  
CTTTGTCCAC ACCTGTCCCTG CTGCCTGCTG TGGACTTCAC CTTGGGAGAA 150  
TGGAAAACCC AGACGGAGCA GACAAAGGCA CAGGATGTCC TGGGAGCCAC 200  
AACCCCTCTG CTGAGGCAG TGATGACAGC ACGGGGACAA GTGGGACCCC 250  
CTTGCTCTC ATCCCTGCTG GTGCAGCTTT CTGGACAGGT TCGCCTCCTC 300  
CTCGGGGCCC TGCAGGACCT CTTGGAATG CAGCTTCCTC CACAGGGAAG 350  
GACCACAGCT CACAAGGATC CCAGTGCCAT CTTCTGAAC TTCCACAAAC 400  
TGCTCCGAGG AAAGGTGCGT TTCCTGCTCC TTGTAGTGGG GCCCTCCCTC 450  
TGTGCCAAGA GGGCCCCACC CGCCATAGCT GTCCCGAGCA GCACCTCTCC 500  
ATTCCACACA CTGAACAAGC TCCCAAACAG GACCTCTGGA TTGTTGGAGA 550  
CAAACCTCAG TATCTCAGCC AGAACTACTG GCTCTGGATT TCTCAAGAGG 600  
CTGCAGGCAT TCAGAGCCAA GATTCTCGGT CTGCTGAACC AAACCTCCAG 650  
GTCCCTAGAC CAAATCCCTG GACACCAGAA TGGGACACAC GGACCCTTGA 700  
GTGGAATCA TGGACTCTTT CCTGGACCCC AACC CGGGC CCTCGGAGCT 750  
CCAGACATTC CTCCAGCAAC TTCAGGCATG GGCTCCCGGC CAACCTACCT 800  
CCAGCCTGGA GAGTCTCCTT CCCCAGCTCA CCCTTCTCCT GGACGATACA 850  
CTCTCTTCTC TCCTTCACCC ACCTCGCCCT CCCCACAGT CCAGCTCCAG 900  
CCTCTGCTTC CTGACCCCTC TGGATCACA CCCAACTCTA CCAGTCTCT 950  
TCTATTGCA GCTCACCTC ATTTCCAGAA CCTGTCTCAG GAAGAGTAAG 1000  
GTGCTCAGAC CCTGCCAACT TCAGCA 1026

(i) **Характеристики** по следующим параметрам:

- Длина: 1014 см
- Тип конструкции: односкатная
- Средняя температура: 10°C
- Толщина: 10 см

002 GTTCTGTTCAA ATAAATCTCTG AGGCGCGAGT GTCTGCTCTCTG CTGCGCGCGA  
001 CTAATTACAG ACCCGTGTCCG GAGTCAGAGG GACATCTCTCTG TACCGCTTACAT  
001 AAGAGGGGTTG CACTTCAGGT GTCTCTCTCTG GTCTCTCTCTG CACCGCTTCTG  
002 CACCGAGGGGT CCTCTGAGAG AGCGAAAGC AGAGGGAGAG CCGCAAAAGT  
002 CCGCGAGGGTG AACAGGGGGCA GAGAGTATGT GAGCGAGCTGTG GTCTTCTCGAA  
002 GTCTCTCTCTG TGGAGAGAGT TTCTGAGAGT GTCTCTCTCTG CTCTCTCTCTG  
002 ACTCGAGAGAG AGGAAAGGGAG GTAAAGGTTCTG TCGAGGAGAGT CCGGGGGGTG  
004 AAGGAGGGCTG GTCAAGAGCG TTCAAGTCTG TCTACCGTGA CCGTACGAGC  
004 GAGAGAGGGT GTCTCTCTCTG CCGGGGTGATG TTCTCTCTCTG TTCTCTCTCTG  
002 TCGAGAGAGT TACCTCTCTG GAGAGAGGGG TGTCTGATAG CCGCAAGCGG  
002 ATGAGCTCAA AGAGAGGGTG TTAGGTCTCTG AGGAGAGAGC CTGAGAGAGC  
002 GTTACGAGAG TCGAGAGAGT GTTTAGGTCT CCGTCTCTGA GACCGAGCTG  
002 AGAGAGATCG TCGAGCTCTG AACCAAGTCT TCTGTCTCTG AGAGAGAGAG  
002 GTACTTAAGG TGAGTTCTCTG GCGAGAGAG GTAAAGAGAG AGGTCTCTGA  
002 TCTTACAGAG CCGGAGGGT CCGGGGGGGG AACCGGAGGT CTTTCTCTG  
002 AGAGGTCTGA CTTCTCTCTG AGCGGGGGT GGTCTCTCTG TTCAAGAGC  
GTCTCTCTCC CCAGCTCACC CTCTCTCTGG ACGATACACT CTCTCTCTC 850  
CTTCAACCAC CTCGCCCTCC CCCACAGTCC AGCTCCAGCC TCTGCTCTCT 900  
GACCCCTCTG CGATCACACC CAACTCTACC AGTCTCTCTC TATTGCAGC 950  
TCACCCCTCAT TTCCAGAACC TGTCTCAGGA AGAGTAAGGT GCTCAGACCC 1000  
TGCCAACCTC AGCA 1014

(1) Информация о последовательности №31

(i) Последовательность аминокислот:  
(A) Длина: 328 аминокислот  
(B) Тип аминокислот:  
(D) Топология: мембрана

(ii) Описания последовательности №31

1 Ser Pro Ala Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu 12  
2  
30 Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Gly Arg Leu Ser Gln Cys Pro 30  
32  
40 Asp Ile Asn Pro Leu Ser Thr Pro Val Leu Pro Ala Val Asp 40  
42  
50 Phe Thr Leu Gly Gln Thr Gln Thr Gln Thr Lys Thr Lys Ala 50  
52  
60 Gln Asp Val Leu Gly Ala Thr Thr Leu Leu Leu Gln Ala Val Met 60  
62  
70 Thr Ala Arg Gly Gln Val Pro Cys Leu Ser Ser Leu Leu 70  
72  
80 Val Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln 80  
82  
90 Asp Leu Leu Gly Met Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro 90  
92  
100 Ser Ala Ile Phe Leu Asn Phe Gln Leu Leu Arg Gly Lys Val 100  
102  
110 Arg Phe Leu Leu Val Gly Pro Ser Leu Cys Ala Lys Arg 110  
112  
120 Ala Pro Pro Ala Ile Ala Val Pro Ser Thr Ser Pro Phe His 120  
122

Thr Leu Asn Lys Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr 170 180  
175  
Asn Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Phe Leu Lys 185 195  
190  
Arg Leu Gln Ala Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln 200 210  
205  
Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly His Gln Asn Gly Thr 215 225  
220  
His Gly Pro Leu Ser Gly Ile His Gly Leu Phe Pro Gly Pro Gln 230 240  
235  
Pro Gly Ala Leu Gly Ala Pro Asp Ile Pro Pro Ala Thr Ser Gly 245 255  
250  
Met Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Leu Gln Pro Gly Glu Ser Pro Ser 260 270  
265  
Pro Ala His Pro Ser Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Phe Ser Pro Ser 275 285  
280  
Pro Thr Ser Pro Ser Pro Thr Val Gln Leu Gln Pro Leu Leu Pro 290 300  
295  
Asp Pro Ser Ala Ile Thr Pro Asn Ser Thr Ser Pro Leu Leu Phe 305 315  
310  
Ala Ala His Pro His Phe Gln Asn Leu Ser Gln Glu Glu 320 325 328



(2) Информация о последовательности №22

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 5141 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: двойная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №22

TTCGAGCTCG CCCGACATTG ATTATTGACT AGAGTCGATC GACAGCTGTG 50  
GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA 100  
GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCАATTAGT CAGCAACCAG GTGTGGAAAG 150  
TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA 200  
GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAАСТCC GCCCATCCCG CCCCTAАСТC 250  
CGCCCAGTTC CGCCCATCTC CGCCCCCATG GCTGACTAAT TTTTТTТTТT 300  
TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG 350  
AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAAGCTA GCTTATCCG 400  
CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA 450  
GTACCCCTTA TAGAGCGATA AGAGGATTTT ATCCCGCTG CCATCATGGT 500  
TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CCAAAATATG GGGATTGGCA 550  
AGAACGGAGA CCTACCTGG COTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC 600  
CAAAGAATGA CCACAACCTC TTCAGTGGAA GSTAAACAGA ATCTGGTGAT 650  
TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC TGAGAAGAAT CGACCTTAA 700  
AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA 750  
GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA 800  
ACAACCGGAA TTGGCAAGTA AAGTAGACAT GGTТTGGATA GTCGGAGGCA 850  
GTTCTGTТTТA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT TAGACTCTTT 900  
GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT 950  
TGATTТGGGG AAATATAAAC CTCTCCAGAG ATACCAGGC GTCTCTCTG 1000  
AGGTCCAGGA GGAАААAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG 1050  
AAAGACTAАC AGGAAGATGC TTTCAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT 1100  
ATGCATTTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG CTGGCTTTAG ATCCCTTGG 1150  
CTTCGTТАGА ACGCGGCTAC AATTAAATACA TAACCTTATG TATCATAAC 1200  
ATACGATTTA GSTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA 1250  
CAGGTGTCCA CTCCAGGTC CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG 1300

GTGACTCTA GAGGATCCCC GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC 1350  
AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC 1400  
AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTCACCT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT 1450  
CCAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT 1500  
CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAGAGGA ACTTGGTTAG 1550  
GTACCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG 1600  
TGTGGAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA 1650  
TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG 1700  
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG 1750  
CCCCTAATC CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCAGTT CCGCCATTC 1800  
TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG 1850  
CCTCGCCTC TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTGGAGGC 1900  
CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG 1950  
CGCCATTAA ATCCTGCAGG TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTACA 2000  
ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCG 2050  
CACATCCCCC CTTGCGCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCAGT 2100  
CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCCTGATGCG 2150  
GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGTAT TTCACACCGC ATACGTCAAA 2200  
GCAACCATAG TACCGCCCTT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG 2250  
TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT 2300  
CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GCTTCCCGG 2350

[illegible]

004E CAGTAAGAGCT GTTATTCAGAT ACAGCCGCTGG CTCAGCGAGA ACCGCGCGCA  
005E CAGTACGGTA GCGATTCTAG GAGGAGACAG TCAGCGACTCA TGAATTGGTT  
006E GCGGTCAGAA TAGTGAGTAG CAATACCGTC GTGACGTATT AAGAGAAATGA  
007E TTTTCGCGAA TCGAGGAGAG CAGGAGGTA GCAAGAGTCT TCAATTCAGC  
008E AGGCGAAGCG TTGCTAGTTT GCGTCAATGT ACTAGCGGGT AGAAGACGTT  
009E GACGACCGTA GCGACGAGT GCGAGCGACA AACCATAGCG AAGTAAGTGG  
00TE ATCTGATTGA TCAAGCGGTC AATTATCAAA GCGGTTGGA GAGCGGTAAG  
00TE GAGCGTTGAA ATAGCGGAG GTAGGTCAGA TAATTAAGAA GCGCGCTTGG  
008E TAAATAGTGG TTATTTGGTC GGTGGGCTT GCGGGTGGG GTCTTCAGCA  
009E ACAGCGGTCG GCGGTTACT ATGCGGCTCT GGTGGGAGT GCGCGAGGTC  
009E GCGAGTGAGG GCGAGACAT CTATTGATGG TATGCGCTCG CGAATGGTAG  
009E AGTCAGTCCG TGAGTAGAGT CGGTAGACAG ATAAAGGAGG TAGGTATCAA  
0004 TTAGATTTCA TATATAGTCA TTTGAGGAG AGTGTCAATG GTTACGAAAT  
0004 TTTTCGTAGA AGTGAGTCTA GAGAAATTTA ATTTTACTT GAAATTTAG  
0014 GAGTCAGCTT GCTTTTGAGT GCAATTCCTT AAAAGGAGTA CTCTAATAGT  
0014 TTTTTTCTGT AGAGTTCTTT TAGGAACTA GAAAGGATCG CGCAGAGTGG  
0014 TGCGGACGAT GCGGACGAAA AAAACAAAGG TTTGTCGCTT AATGCGGTC  
0014 GTCAATGGA GCGTTTCTCT GAAAGATCGA GAAGTAGGCG GTTTGTTTGG  
0014 GATGCGGATG TGATCTTCTT GTGATAAGCG ATAGACGCGA GACGAGTTCG  
0014 TGTGCGTCCA TAGATCGCGC AGGATGTCTG AAGAACTTCA CGACCGGATT

GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA,4400  
 CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC 4450  
 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC 4500  
 CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG 4550  
 AAGGGAGAAA GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA 4600  
 GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC 4650  
 TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTGT TGATGCTCGT 4700  
 CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGGC STTTTACGG 4750  
 TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC 4800  
 CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC STTTGAGTGA GCTGATACCG 4850  
 CTCGCCGACG CCGAACGACC GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG 4900  
 GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC CCCGCGGTT GGCCGATTCA 4950  
 TTAATCCAGC TGGCAGACA GGTTCCTCGA CTGGAAGCG GGCAGTGAGC 5000  
 GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA 5050  
 CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA 5100  
 ATTTCACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGAATTA A 5141

(2) Информация о последовательности №23

- (i) Характеристика последовательности:  
 (A) Длина: 21 оснований  
 (B) Тип: нуклеиновая кислота  
 (C) Спиральность: одиночная  
 (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №23

ATGTCNCCNG CNCCNCCNGC N 21

(2) Информация о последовательности №24

- (i) Характеристика последовательности:  
 (A) Длина: 21 оснований  
 (B) Тип: нуклеиновая кислота  
 (C) Спиральность: одиночная  
 (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №24

ATGTCTCCAG CGCCGCCAGC G 21

(2) Информация о последовательности №25

- (i) Характеристика последовательности:  
 (A) Длина: 21 основание  
 (B) Тип: нуклеиновая кислота  
 (C) Спиральность: одиночная  
 (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №25

ATGTCGCCTG CTCCACCTGC T 21

(2) Информация о последовательности №26

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 21 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №26

ATGTCGCCAG CGCCACCAGC C 21

(2) Информация о последовательности №27

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 21 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №27

ATGTCCCCAG CCCCACCCGC A 21

(2) Информация о последовательности №28

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 21 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №28

**ATGTCGCCAG CGCCGCCAGC G 21**

(2) Информация о последовательности №29

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 25 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №29

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu  
1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg  
20 25

(2) Информация о последовательности №30

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 26 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №30

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu  
1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp Xaa Val Leu His Gly Arg Leu  
20 25 26

(2) Информация о последовательности №31

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 25 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №31

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu  
1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg  
20 25

(2) Информация о последовательности №32

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 14 аминокислота
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

Описание последовательности №32

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu  
1 5 10 15

Leu Arg Asp Asp His Val Leu His Gly Arg  
20 25

(2) Информация о последовательности №33

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 9 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №33

Pro Arg Leu Leu Asn Lys Leu Leu Arg  
1 5 9

(2) Информация о последовательности №34

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 45 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №34

GCCGTGAAGG ACGTGGTCGT CACGAAGCAG TTTATTTAGG AGTCG 45

2) Информация о последовательности №35

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 20 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №35

CCNGCNCNC CNGCNTGYGA 20

(2) Информация о последовательности №36

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 21 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №36

NCCRTGNARN ACRTGRTCRT C 21

(2) Информация о последовательности №37

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №37

CCAGCGCCGC CAGCCTGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCCTCGTGA 50  
TGACCACGTT CAGCACGGC 69

(2) Информация о последовательности №38

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №38

GGTCGCGCGG GTCGGACACT GGGGGCTGAG GATTTATTG ACGGAGCACT 50  
ACTGGTGCAA GTCGTGCCG 69

(2) Информация о последовательности №39

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №39

CCAGCACCTC CGGCATGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCTTCGTGA 50  
CGACCACGTC CATCACGGC 69

(2) Информация о последовательности №40

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №40

GGTCGTGGAG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTTATTG ACGAAGCACT 50  
GCTGGTGCA GTAGTGCCG 69



(2) Информация о последовательности №41

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №41

CCAGCACCGC CGGCATGTGA CCCCCGACTC СТАААТАААС TGCTTCGTGA 50  
CGATCATGTC TATCACGGT 69

(2) Информация о последовательности №42

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №42

GGTCGTGGCG GCCGTACACT GGGGGCTGAG GATTATTG ACGAAGCACT 50  
GCTAGTACAG ATAGTGCCA 69

(2) Информация о последовательности №43

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 37 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №43

GCTAGCTCTA GAAATTGCTC CTCGTGGTCA TGCTTCT 37

(2) Информация о последовательности №44

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 22 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №44

CAGTCTGCCG TGAAGGACAT GG 22

(2) Информация о последовательности №45

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 24 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №45

TGTGGACTTT AGCTTGGGAG AATG 24

(2) Информация о последовательности №46

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 21 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №46

GGTCCAGGGA CCTGGAGGTT TG 22

(2) Информация о последовательности №47

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 31 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №47

ATCGATATCG ATAGCCAGAC ACCCCGGCCA G 31

(2) Информация о последовательности №48

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 36 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №48

GCTAGCTCTA GACAGGGAAG GGAGCTGTAC ATGAGA 36

(2) Информация о последовательности №49

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 24 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №49

CTCCTTGGAA CCCAGGGCAG GACC 24

(2) Информация о последовательности №50

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 24 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №50

GGTCCTGCCC TGGGTCCAA GGAG 24

(2) Информация о последовательности №51

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 27 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №51

CTGCTCCGAG GAAAGGACTT CTGGATT 27

(2) Информация о последовательности №52

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 27 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №52

AATCCAGAAG TCCTTTCCTC GGAGCAG 27

(2) Информация о последовательности №53

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 28 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №53

CCCTCTGCGT CGCGGCGGCC CCACCCAC 28

) Информация о последовательности №54

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 28 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №54

GTGGGTGGGG CCGCCGCGAC GCAGAGGG 28

(2) Информация о последовательности №55

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 35 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №55

GACTCGAGGA TCCATCGATT TTTTTTTTTT TTTT 35

(2) Информация о последовательности №56

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 17 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №56

GACTCGAGGA TCCATCG 17

(2) Информация о последовательности №57

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 32 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №57

GCTAGCTCTA GAAGCCCGGC TCCTCCTGCC TG 32

(2) Информация о последовательности №58

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 21 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №58

CGAAATTAAC CCTCAATAAA G 21

(2) Информация о последовательности №59

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 103 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №59

TGCAGCAAGG GCTACTGCCA CACT CGAGCT GCGCAGATGC TAGCCTCAAG 50  
ATGGCTGATC CAAATCGATT CCGCGGCAAA GATCTTCCGG TCCTGTAGAA 100  
GCT 103

(2) Информация о последовательности №60

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 103 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №60

AGCTTCTACA GGACCGGAAG ATCTTTGCCG CGGAATCGAT TTGGATCAGC 50  
CATCTTGAGG CTAGCATCTG CGCAGCTCGA GTGTGGCAGT AGCCCTTCT 100  
JCA 103

(2) Информация о последовательности №61

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 18 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №61

TCTCGCTACC GTTTACAG 18

(2) Информация о последовательности №62

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 25 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №62

CAGGTACCCA CCAGGCGGTC TCGGT 25

(2) Информация о последовательности №63

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 18 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №63

GGGCCATGAC ACTGTCAA 18

(2) Информация о последовательности №64

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 40 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №64

GACCGCCACC GAGACCGCCT GGTGGGTACC TGTGGTCSTT 40

(2) Информация о последовательности №65

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 32 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №65

ATCGATATCG ATCAGCCAGA CACCCCGGCC AG 32

(2) Информация о последовательности №66

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 35 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №66

TCTAGATCTA GATCACCTGA CGCAGAGGGT GGACC

(2) Информация о последовательности №67

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 33 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №67

AGTCGACGTC GACGTCGGCA GTGTCTGAGA ACC 33

(2) Информация о последовательности №68

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 36 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №68

AGTCGACGTC GACTCASCSTG ACGCAGAGGG TGGACC 36

2) Информация о последовательности №69

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 62 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №69

CGCGTATGCC AGCCCGGCTC CTCCTGCTTG TGACSTCCGA GTCCTCAGTA 50  
AAGTGCITCG TG 62

(2) Информация о последовательности №70

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 61 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №70

ATACGGTCGG GCCGAGGAGG ACGAACACTG GAGGCTCAGG AGTCATTGA 50  
CGAAGCACTG A 61

(2) Информация о последовательности №71

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 37 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №71

STAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTTCTCTTAA 37

(2) Информация о последовательности №72

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 37 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №72

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGAAGA ATTGCGC 37

(2) Информация о последовательности №73

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №73

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT ATCACCATCA CCATCACCAT 50  
CACATCGAAG GTCGTAGCC 69

(2) Информация о последовательности №74

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 62 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №74

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGTAGT GGTAGTGGTA GTGGTAGTGT 50  
AGCTTCCAGC AT 62

(2) Информация о последовательности №75

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 69 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №75

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT ATCACCATCA CCATCACCAT 50  
CACATCGAAC CACGTAGCC 69

(2) Информация о последовательности №76

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 62 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №76

TTAATACTTT TTCTTATAGC GTAAAGTAGT GGTAGTGGTA GTGGTAGTGT 50  
AGCTTGGTGC AT 62

(2) Информация о последовательности №77

(i) Характеристика последовательности:

- (A) Длина: 19 оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Спиральность: одиночная
- (D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №77

TCCACCCTCT GCGTCAGGT 19

(2) Информация о последовательности №78

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 18 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №78

GGAGACGCAG TCCATCGA 18

(2) Информация о последовательности №79

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 62 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №79

GCAGCAGTTC TAGAATTATG TCNCCNGCNC CNCNGCNTG TGAACCTCGA 50  
GTTCTCAGTA AA 62

(2) Информация о последовательности №80

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 49 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №80

ACACTGGAGG CTCAGAGTC ATTTGACGAA GCACTGAGGG TACAGGAAG 49

(2) Информация о последовательности №81

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 45 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №81

CTAGAATTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTA TCGAAGGTCTG TAGCC 45

(2) Информация о последовательности №82

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 38 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №82

TTAATACTTT TTCTATAGC GTAAATAGCT TCCAGCAT 38

(2) Информация о последовательности №83

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 45 оснований  
(B) Тип: нуклеиновая кислота  
(C) Спиральность: одиночная  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №83



Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe His His His His His His His His  
1 5 10 15  
Ile Glu Pro Arg Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Cys Val Arg Arg  
20 25 30  
Ala  
31

(2) Информация о последовательности №88

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 7 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №88

Thr Thr Ala His Lys Asp Pro  
1                      5                      7

(2) Информация о последовательности №89

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №89

His Val Leu His  
1                      4

(2) Информация о последовательности №90

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №90

Ser Arg Leu Ser  
1                      4

(2) Информация о последовательности №91

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №91

Ser His Val Leu  
1                      4

(2) Информация о последовательности №92

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №92

His Ser Arg Leu  
1                      4

(2) Информация о последовательности №93

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №93

Ala Val Asp Phe  
1 4

(2) Информация о последовательности №94

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №94

Ser Leu Gly Glu  
1 4

(2) Информация о последовательности №95

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №95

Ala Val Thr Leu  
1 4

(2) Информация о последовательности №96

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №96

Leu Leu Glu Gly  
1 4

(2) Информация о последовательности №97

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №97

Leu Ser Ser Leu  
1 4

(2) Информация о последовательности №98

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №98

Leu Gly Gln Leu  
1 4

(2) Информация о последовательности №99

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 5 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №99

Cys Xaa Leu Ser Ser  
1 5

(2) Информация о последовательности №100

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №100

Leu Leu Gly Gln  
1 4

(2) Информация о последовательности №101

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №101

Ser Ser Leu Leu  
1 4

(2) Информация о последовательности №102

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №102

Gly Gln Leu Ser  
1 4

2) Информация о последовательности №103

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №103

Cys Leu Ser Ser  
1 4

(2) Информация о последовательности №104

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №104

Leu Gln Ser Leu  
1 4

(2) Информация о последовательности №105

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №105

Leu Gly Thr Gln  
1 4

(2) Информация о последовательности №106

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №106

Ala Leu Gln Ser  
1 4

(2) Информация о последовательности №107

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №107

Leu Leu Gly Thr  
1 4

(2) Информация о последовательности №108

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №108

Asn Ala Ile Phe

1 4

(2) Информация о последовательности №109

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №109

Leu Ser Phe Gln

1 4

(2) Информация о последовательности №110

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 22 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №110

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu

1 5 10 15

Leu Arg Asp Ser His Val Leu

20 22

(2) Информация о последовательности №111

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 24 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №111

His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr

1 5 10 15

Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe

20 24

(2) Информация о последовательности №112

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 23 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №112

Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln

1 5 10 15

Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu

20 23

(2) Информация о последовательности №113

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 21 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №113

Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	Leu	Gly	Pro	Thr
1				5					10				15	
Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu									
				20	21									

(2) Информация о последовательности №114

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 16 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №114

Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln
1				5				10					15	
Ser														
16														

(2) Информация о последовательности №115

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 22 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №115

Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His
1				5				10					15	
Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe								
				20	22									

(2) Информация о последовательности №116

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 25 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №116

Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met
1				5				10					15	
Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg					
				20			25							

(2) Информация о последовательности №117

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №117

Met	Pro	Pro	Ala
1			4

(2) Информация о последовательности №118

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 5 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №118

Met Ala Pro Pro Ala  
1 5

(2) Информация о последовательности №119

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 6 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №119

Met Pro Ala Pro Pro Ala  
1 5 6

(2) Информация о последовательности №120

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 7 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №120

Met Ser Pro Ala Pro Pro Ala  
1 5 7

(2) Информация о последовательности №121

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 4 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №121

Ala Pro Pro Ala  
1 4

(2) Информация о последовательности №122

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 5 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №122

Pro Ala Pro Pro Ala  
1 5



(2) Информация о последовательности №123

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 6 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №123

Ser Pro Ala Pro Pro Ala

1 5 6

(2) Информация о последовательности №124

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 4 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №124

Val Arg Arg Ala

1 4

(2) Информация о последовательности №125

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 5 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №125

Val Arg Arg Ala Pro

1 5

(2) Информация о последовательности №126

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 6 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №126

Val Arg Arg Ala Pro Pro

1 5 6

(2) Информация о последовательности №127

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 7 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №127

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr

1 5 7

(2) Информация о последовательности №128

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 8 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №128

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr
1				5			8

(2) Информация о последовательности №129

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 9 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №129

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala
1				5				9

(2) Информация о последовательности №130

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 10 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №130

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val
1				5					10

(2) Информация о последовательности №131

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 11 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №131

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro
1				5					10	11

(2) Информация о последовательности №132

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 12 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №132

Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Ser
1				5					10		12

(2) Информация о последовательности №133

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 13 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №133

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg  
1 5 10 13

(2) Информация о последовательности №134

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 14 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №134

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr  
1 5 10 14

(2) Информация о последовательности №135

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 15 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №135

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser  
1 5 10 15

(2) Информация о последовательности №136

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 16 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №136

16  
Ген  
1 2 10 12  
Ala Val Val Val Pro Pro Thr Thr Val Val Pro Ser Val Thr Ser

(2) Информация о последовательности №137

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 17 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №137

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser  
1 5 10 15  
Leu Val  
17

(2) Информация о последовательности №138

- (i) Характеристика последовательности:  
(A) Длина: 18 аминокислот  
(B) Тип: аминокислота  
(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №138

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser  
1 5 10 15  
Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu  
20 23

(2) Информация о последовательности №144

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 24 аминокислот

(B) Тип: аминокислота

(D) Топология: линейная

(xi) Описание последовательности №144

Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser

1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu

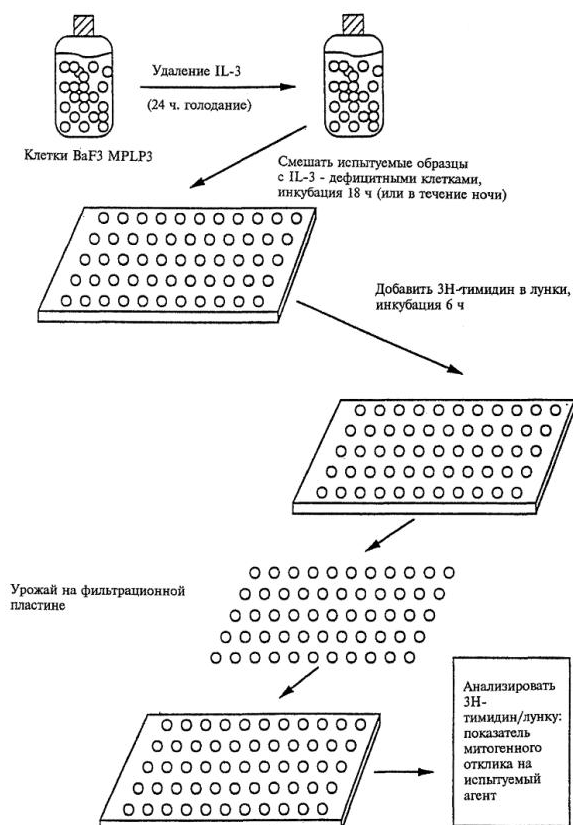
20 23

1 tcttctaccatctgctccccagagggtgctgctgtgcacttgggtcctggagcccttctccaccggatagattcctcacccttggccgcctttg  
101 cccaccctactctgcccagaagtgaagagcctaagcgcctccatggccccaggaaggattcaggggagaggcccaaacaggggaccacgccagcca  
MetGluLeuThrGluLeuLeuLeuValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCysAsp  
201 gacaccccgccagaATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCGGCTCCTCCTGCTTGTG  
LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeu  
301 ACCTCCGAGTCTCAGTAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGCCAGAGGTTACCCCTTTGCCTACACCTGTCTGTCT  
ProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspileuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGluGlyVal  
401 GCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTGACCTTCTGTGGAGGGAGTG  
MetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu  
501 ATGGCAGCACGGGACAACCTGGGACCACTTGCCCTCTCATCCCTCTGCGGCGAGCTTCTGGACAGGTCCGCTCTCTCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCC  
GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPhe  
601 TTGGAACCCAGCTTCTCCACAGGCGAGGACACAGCTCACAGGATCCCAATGCCATCTTCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTT  
LeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeuThrLeuAsnGluLeu  
701 CCTGATGCTTGTAGAGGGTCCACCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACACAGTGTCCCCAGCAGAACTCTCTAGTCTCACACTGAACGAGCTC  
ProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLysIle  
801 CCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCTAGAGCCAAGA

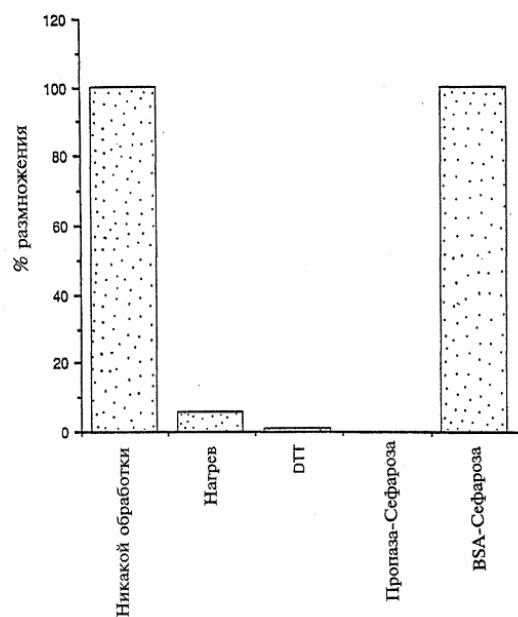
Фиг.1А

ProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPhePro  
901 TTCTGCTGTCTGTAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCCGGATACCTGAAACAGGATACACGAACCTCTTGAATGGAACCTCGTGGACTCTTCTC  
GlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnProGlyTyrSerProSer  
1001 TGGACCCTCACGCAGGACCTAGGAGCCCCGACATTTCTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCAACCTCCAGCCTGGATATTCTCTCTCC  
ProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSerAla  
1101 CCAACCCATCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGTCTCTGACCCCTTCTG  
ProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly  
1201 CTCCAACGCCCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCTACACCCACTCCAGAAATCTGTCTCAGGAAGGGTAagggttctcagacactgccgacatc  
1301 agcattgtctcatgtacagctcccttccctgcagggcgcccttgggagacaactggacaagatttctactttctcctgaaacccaaagccctggtaaaa  
1401 gggatacacaggactgaaaagggatcatttttctactgtacattataaaccttcagaagctatttttttaagctatcagcaatactcatcagagcagcta  
1501 gctctttgggtctattttctgcagaaatttgcaactcactgattctctacatgctctttttctgtgataactctgcaaaggcctgggctggcctggcagtt  
1601 gaacagagggagagactaaccttgagtcagaaaaacagagaaagggtaatttcttctgcttcaaattcaaggccttccaacgcccccatcccttttactat  
1701 cattctcagtgaggactctgatcccatattcttaacagatctttactcttgagaaatgaataagctttctctcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

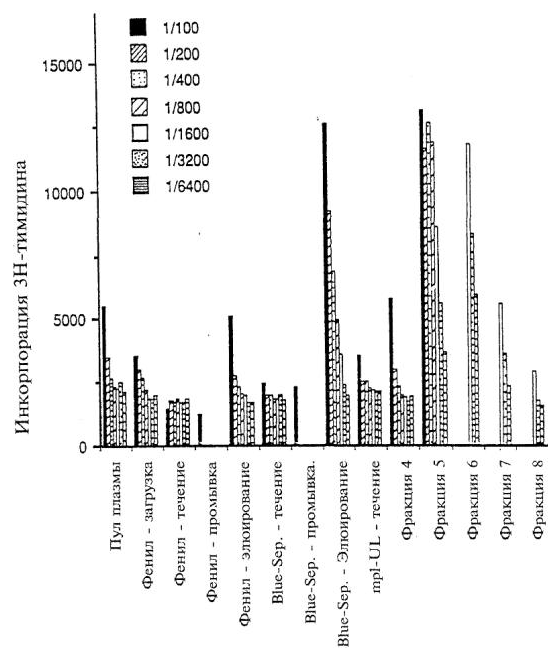
Фиг.1В



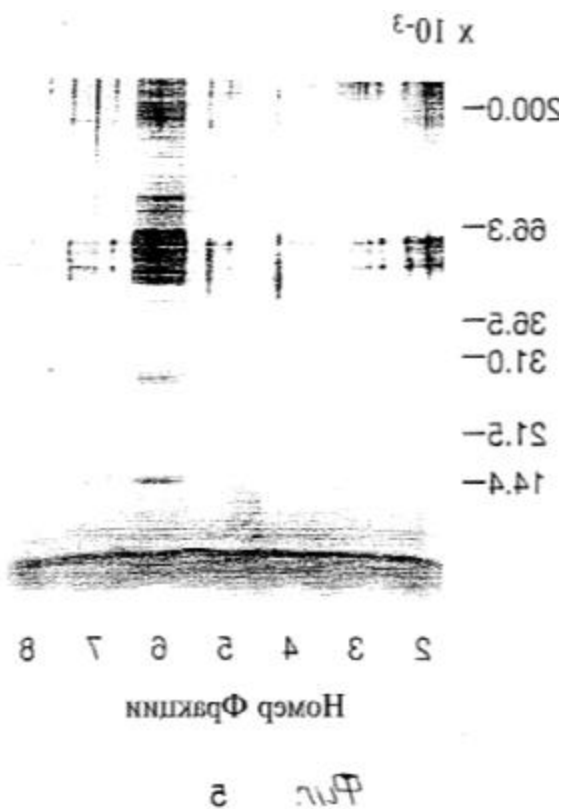
Фиг.2

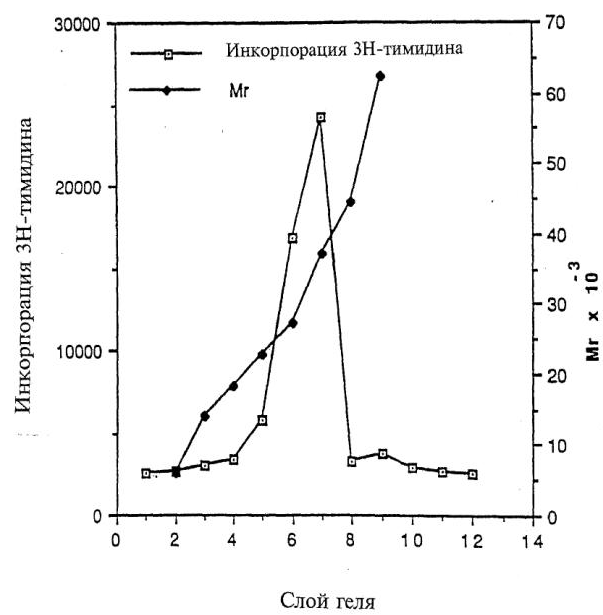


Фиг. 3

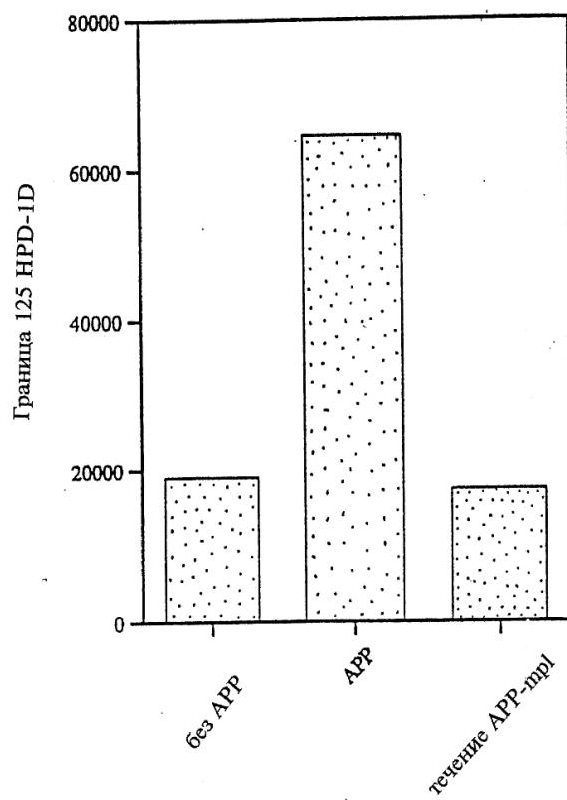


$\varphi_{UL}$  4



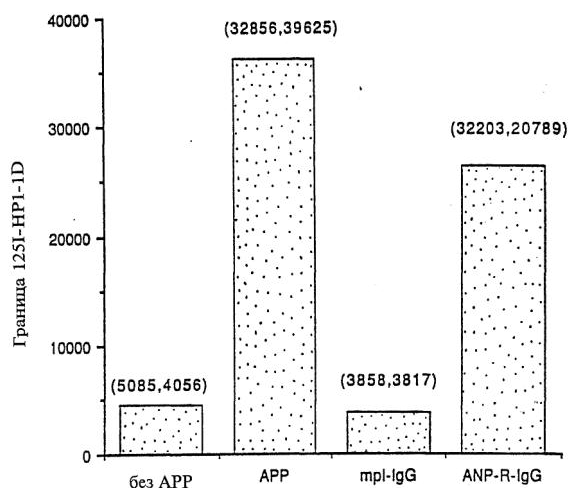


Фиг. 6



Фиг. .7





Фиг. 8

1 GAATTCCTGG AATACCAGCT GACAATGATT TCCTCCTCAT CTTTCAACCT CACCTCTCCT CATCTAAGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT  
CTTAAGGACC TTATGGTCTGA CTGTACTTAA AGGAGGAGTA GAAAGTTGGA GTGGAGAGGA GTAGATTCTT AACGAGGAGC ACCAGTACGA AGAGGATTGA

101 GCAAGGCTAA CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CCTGCTTGTT ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGGTGA  
CGTTCCGATT GCGACAGGTC GGGCCGAGGA GGACGAACAC TGGAGGCTCA GGAGTCATT GACGAAGCAC TGAGGGTACA GGAAGTGTGCT TCTGACCACT

201 GAACTCCCAA CATTATCCCC TTTATCCGCG TAACTGGTAA GACACCCATA CTCCAGGAA GACACCATCA CTTCTCTTAA CTCCTTGACC CAATGACTAT  
CTTGAGGGTT GTAATAGGGG AAATAGGCGC ATTGACCATT CTGTGGGTAT GAGGGTCTTT CTGTGGTAGT GAAGGAGATT GAGGAAGTGG GTTACTGATA

301 TCTTCCCATTA TTGTCCCGAC CTACTGATCA CACTCTCTGA CAAGAATTAT TCTTCACAAT ACAGCCCGCA TTTAAAAGCT CTCGTCTAGA  
AGAAGGGTAT AACAGGGGTG GATGACTAGT GTGAGAGACT GTTCTTAATA AGAAGTGTTA TGTCGGGCGT AAATTTTCGA GAGCAGATCT

Фиг. 9

h-ML 1 S P A P P A C D L R V L S K L L R D S H V L H S R L S Q C P E V H P L P T P V L L P A V D F S L G E  
h-epo 1 A P P R L I C D S R V L E R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C S L N E N I T V P D T K V N F Y A

h-ML 51 W K T Q M E E T K A Q D I L G A V T L L L E G V M A A R G Q L G P T C L S - - S L L G Q L S G Q V R  
h-epo 51 W K R M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S

h-ML 99 L L - - L G A L Q S L L G T Q - - L P P Q G R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R G K V R F L -  
h-epo 101 G L R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I T A D T F R K L F R V Y S N F L R

h-ML 143 - - M L V G G S T L C V R R A P P T T A V P S R T S L V L T L N E L P N R T S G L L E T N F T A S A  
h-epo 151 G K L K L Y T G E A C R T G D R

h-ML 191 R T T G S G L L K W Q Q G F R A K I P G L L N Q T S R S L D Q I P G Y L N R I H E L L N G T R G L F

h-ML 241 P G P S R R T L G A P D I S S G T S D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P

h-ML 291 T L P T P V V Q L H P L L P D P S A P T P T P T S P L L N T S Y T H S Q N L S O E G

Фиг. 10

hML 1 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE  
hML2 1 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE  
hML3 1 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE  
hML4 1 SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPTPVLLPAVDFSLGE

hML 51 WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL  
hML2 51 WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL  
hML3 51 WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL  
hML4 51 WKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRL

hML 101 LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL  
hML2 101 LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTL  
hML3 101 LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKDFWIVGDKLH  
hML4 101 LGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKDFWIVGDKLH

hML 151 CVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW  
hML2 147 CVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNLNLPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKW  
hML3 149 CLSQ-----NYWL-----WASLEVAAGIQSQDSWSAEPNLQ-  
hML4 145 CLSQ-----NYWL-----WASLEVAAGIQSQDSWSAEPNLQ-

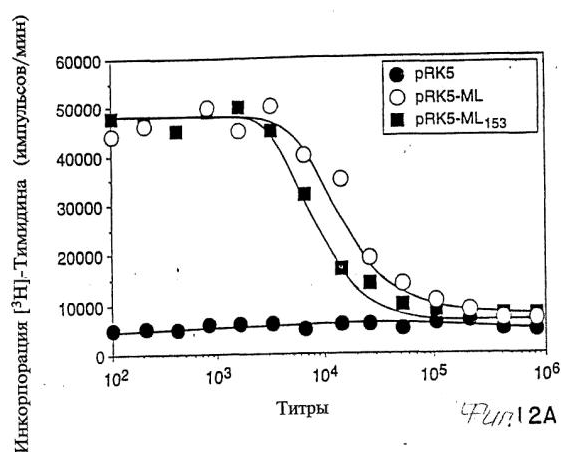
### Fun IIA

hML 201 QQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTLGA  
hML2 197 QQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPGPSRRTLGA  
hML3 179 VPGPNPRIPEEQDTRTLEWNSWTLSWTLTQDPRSPGHFRLRNIRHRLPA  
hML4 175 VPGPNPRIPEEQDTRTLEWNSWTLSWTLTQDPRSPGHFRLRNIRHRLPA

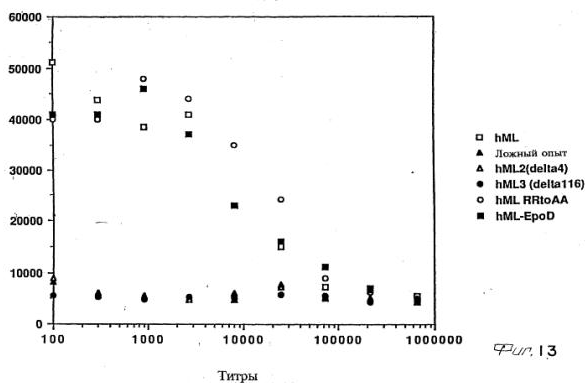
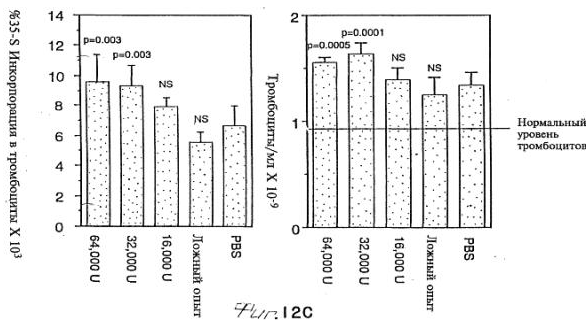
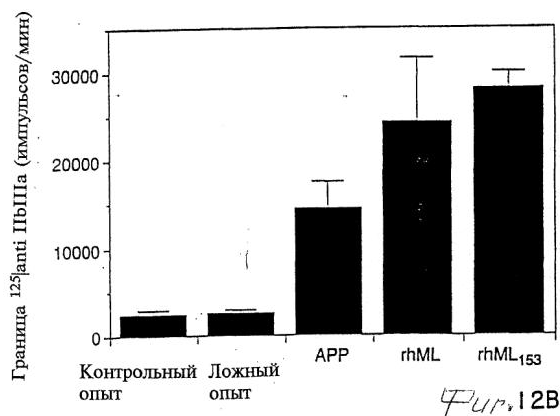
hML 251 PDISSGTS D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P T L P T P V V Q L H  
hML2 247 PDISSGTS D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P T L P T P V V Q L H  
hML3 226 T Q - - - - - P P A W I F S F P - - - - - N P S S Y W T V Y A L P S S - - - - -  
hML4 222 T Q - - - - - P P A W I F S F P - - - - - N P S S Y W T V Y A L P S S - - - - -

hML 301 PLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG  
hML2 297 PLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLSQEG  
hML3 251 THLAHP CGPAPP PAS - - - - -  
hML4 247 THLAHP CGPAPP PAS - - - - -

### Fun IIB



### Fun 12A



1 ccagcctccttctcttctgttccttggtcatgcctgcctcctgtctcctgtctctcctccacacacacccactatcctcccagctatccctacaccc  
101 tcttctctaattcttgggagacatctcgtctggctggcgggaaaaatccaggatctaggccacacttctcagcagacatgcccatcctggggaggagga  
201 acaggagagagcctgaggaagtcttgggggacagggggatgtagggatcaaggtcaggccaggaagccctgaggacagagactgtggggagactgggac  
301 tgggaagaaagcaaaggagctagagccaggccaaaggaaagggggccagcaggagggtatttgcggggagggtccagcagctgtcttctctaagaca  
401 gggacacatgggcctggttattcctcttgtcacatgtggaacggtaggagatggaagacggagacagaacaagcaaaggaggccctgggacagagggtc  
501 tgytgtgtagccatccaagccactggaccccgagcagcagcactaagctcaggcttaaccagtgccagctgtgcgcacatatactgtcccccacact  
601 gacagtccactcaaccgctccaaccctttcccccataacaccaaccataacaggagatttctctcatgtgggcaatatccgtgttcccacttcgaaagg  
701 gggatgacaagataggactccctaggggattacagaaagaaaagcaggaaagcaagcatcctgttgatttcagcagcagggtatgagtccaggga  
801 gaaatttggatagccaggagtgaaaacccaccaaactcttaacaagacctctgtgcttcttcccagcaacacaaatgtcctgccagattcctcctgga  
901 aaaaaacttctgtcctgttcccctccaggtccaggttgcccatgtccaggaaaagatggatccccctatccaaatcttctccgtggtgtgtggtg  
1001 gaggagtggaccctggtccaggcaggggctccagggaagagaaggcgtcacttccgggggcttcaccagtgtctggtgggtcccttctctgattgggca  
  
1101 gaagtggccaggcaggcgatgacctgctgtgtggaggggctgtgccccaccgccacatgtctTCCTACCCATCTGCTCCCCAGAGGGCTGCCTGCTG  
1201 TGCACTTGGGTCTGGAGCCCTTCTCCACCCGgtgagtgccagcagggtgtgggggtatgtgagggtagaaaggacagcaagagaaaatgggctccag  
1301 ctgggggaggggagggcaaaactggaacctacaggcactgaccttctgtcagaagagtgtagccttcccagaatgggaggagcagggcagagcaggggtag  
1401 ggggtgggtgctggttcttgagggaactgatcacttacttgggtggaatacagcagacccctggctggccctaaaggaaaggggacatgagcccaggagaa  
1501 aataagagagggagctgcacttagggcttagcaaacacagtagtaagatggacacagcccaatccccattcttagctggctattcctcgtagcttaag  
1601 gttctgaatctggtgctggggaagctggggcaggcaagccaggggcgcaaggagagggtaatgggaggaggggccactcatgttgacagacctacaggaaa

< Start of cDNA sequence; Exon 1 >

< Exon 2 >  
2901 GATAGATTCTCTACCCCTTGGCCCGCCTTGGCCCCACCTACTCTGCCCAGAAGTGCAAGAGCCTAAGCCGCCTCCATTGGCCCCAGGAAGGATTACAGGGGA  
1 MetGluLeuThrG  
3001 GAGGCCCAAAACAGGGAGCCACGCCAGCCAGACACCCCGCCAGAATGGAGCTGACTGgtgagaacacacctgaggggctgagggccatatggaacatga  
3101 cagaaggggagagagaaagggagacacgctgcagggggcaggaagctgggggaacccattctccaaaaataaggggtctgaggggtggatttccttggggt  
< Exon 3 >  
6 luLeuLeuLeu  
3201 tcagggtctgggttctgaatgggaattcctggaataccagctgacaatgatttctctctcatctttcaacctcacctctctctcatctaaagAATTGCTCCTC

43 LeuHisSerArgLeu  
3401 TCCTTCACAGCAGACTGgtgagaactcccaacattatccccctttatccgcgtaactggtaagacaccataactcccaggaagacaccatcacttctctta  
3501 actccttgacccaatgactattcttcccatattgtccccacctactgatcacactctctgacaagaattattcttcacaatacagcccgcatttaaaggc  
3601 tctcgtctagatagtagtactcatggaggactagcctgcttattaggctaccatagctctctctatttcagetcctcttctccccccaccaatctttttcaa  
          < Exon 4 >  
48 SerGlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnMet  
3701 cagAGCCAGTGCCCAGAGGTTCACCCCTTGCCCTACACCTGTCTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAAACCCAGATGgtaagaaggc  
3801 catccctaaccttggcttcctaagtctgtcttcagtttccactgcttcccatggattctccaacattcttgagctttttaaaaaatatctcaccttca  
3901 gcttggccaccctaaccaatctacattcacctatgatgatagcctgtggataagatgatggcttgcagggtccaatatgtgaatagatttgaagctgaac  
4001 accatgaaaagctggagagaaaatcgctcatggccatgcctttgacctattccygttcagctcttcttaaattggcatgaagaagcaagactcatatgtcat  
4101 ccacagatgacacaaagctgggaagtaccactaaaaataacaaaagactgaatcaagattcaaatcactgaaagactagggtcaaaaacaagggtgaaacaac  
4201 agagatataaaacttctacatgtgggcccggggctcacgcctgtaatcccgaccttgggaggccgaggcaggcagatcacctgagggcaggagtttgag  
4301 agcagcctggccaacatggcgaaaccccgctctactaagaatacaaaattagccgggcatggtagtgcatgctgtaatccagctacttggaggctg  
4401 aagcaggagaaatcccttgaaccaggaggtggagggttgtagtgagctgagatcatgccaatgcactccagcctgggtgacaagagcaaaactccgtctca  
4501 aaaagaaaaaaaaattctacatgtgtaaatatagtagtaaagtcctattccagctttcaggccacaatgccctgcttccatcatttaagcctctggccct  
4601 agcacttctacgaaaaggatctgagagaattaaattgcccccaaacttaccatgttaacattactgaagctgctattcttaagctagtaattcttgtct  
4701 gtttgatgtttagcatccccatttgtgaaatgctcgtagaactctattccgagtggactacacttaaatatactggcctgaacaccggacatccccct  
4801 gaagacatatgctaatttattaaggaggaccatatataaactaacatgtgtctagaagcagcagcctgaacagaaaagagactagaagcatgttttatggg

9747. 14C

4901 caatagtttaaaaaactaaaatctatctcctaagaacctagcgctcccttcttctcctcaggactgagtcaggggaagaaggcagttctctatgggtcccttc  
 5001 tagtccctttcttttcatccttatgatcattatggtagagtctcatacctacatttagttttatttattattattttgagacggagctctcactctatccc  
 5101 ccaggctggagtgagtgagtgatctcaactcactgcaacctcagcctcccggtatcaagcgattctcctgcctcagctctcccaagtagctgggattac  
 5201 aggtgccaccaccatgccagctaatttttgtatttttggtagagatggggtttccacatgttggccaggctgatcttgaactcctgacctcagggtgat  
 5301 ccacctgcctcagcctcccaagtgtgtgggtattacaggcgtgagccactgcacccagccttcattcagtttaaaaaatcaaatgatcctaagggttttgcag  
 5401 cagaaagagtaaatgttcagcactagaaccaagaggtgtaaacaggcagatttcagcaacgtaagaaaaaggagctcttctcactgaaacca  
 5501 agtgaagaccaggctggactagaggacacgggagtttttgaagcagaggctgatgaccagctgtcgggagactgtgaaggaattcctgcctgggtggg  
 5601 accttggtcctgtccagttctcagcctgtatgattcactctgctggctactcctaaggctccccaccgcttttagtgtgccctttgaggcagtgcgctt  
 77 < Exon 5 >  
 5701 GluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThrLeuLeuLeuGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeu  
 103 GlyProThrCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeuGlyThrGln  
 5801 GGACCCACTTGCCCTCATCCCTCCTGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCCTTGGAAACCCAGGtaagtcccc  
 5901 agtcaagggtatctgtagaaactgttcttttctgactcagtcaccactagaagacctgaggggaagaagggtctctccagggtgactcaagggcagaagagctg  
 6001 atctactaagagtgtccctgccagccacaatgcctgggtactggcatcctgtcttttctacttagacaaggaggcctgagatctggccctggtgtttg  
 133 < Exon 6 >  
 6101 LeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArg  
 GCCTCAGGACCATCCTCTGCCCTCAGCTTCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTCTGAGTTTCCAACACCTGCTCCG  
 =====^Alternative splice site ^C for cDNA clone  
 158 GlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGlySerThrLeuCysValArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeuValLeu  
 6201 AGGAAAGGTGCGTTTCTGTATGCTTGTAGGAGGGTCCACCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACCACAGCTGTCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCTCT  
 ^End of EPO domain  
 191 ThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThrAlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnG  
 6301 ACTCTGAACAGCTCCCAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAACTTCACTGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGG

Fin 14D

225 PheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsnArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThr  
 6401 GATTCAGAGCCAAGATTCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCCTGGACCAATCCCCGGATACCTGAACAGGATACACGAACCTTTGAATGGAAC  
 258 ArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThrLeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeuGlnPro  
 6501 TCGTGGACTCTTCTTGACCTCAGCAGGACCTTAGGAGCCCCGGACATTTCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCAACCTCCAGCCT  
 291 GlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPheProLeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeu  
 6601 GGATATTCTCTTCCCCAACCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCTCTTCCACCCACCTTGCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGC  
 325 ProAspProSerAlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsnLeuSerGlnGluGly: STOP  
 6701 TTCTTGACCTTCTGTCTCAACGCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAACACATCTACACCCACTCCAGAACTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCA  
 6801 GACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCATGTACAGTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAACCTGGACAAGATTCTCTACTTTCTCTGAAACCC  
 6901 AAAGCCCTGGTAAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCTACTGTACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTTTAAGCTATCAGCAATAC  
 7001 TCATCAGAGCAGCTAGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCAGAAATTTGCAACTCACTGATTCTCTACATGCTCTTTTCTGTGATAACTCTGCAAAGGCCTGG  
 7101 GCTGGCCTGGCAGTTGAACAGAGGGAGAGACTAACCTTGAGTCAGAAAACAGAGAAAGGTAATTTCTTTGCTTCAAATTAAGGCCTTCCAACGCCCC  
 7201 CATCCCTTTACTATCATTCTCAGTGGGACTCTGATCCCATATTCTTAACAGATCTTTACTCTTGAGAAATGAATAAGCTTTCTCTCAGaaatgctgtcc  
 ^PolyA site  
 7301 ctatacactagacaaaactgagcctgtataaggaataaatgggagcgccgaaaagctccctaaaaagcaagggaagatgttctctgaggggtggcaatag  
 7401 atccccctcacctgccaccccaaaaaaagctaacaggaagccttgagagcctcacacccaggttaaggctgtgtagacagttcagtaaagacagg  
 7501 acctggatgtgacagctgagcaaacagctagagctttggcagctcagcaggaggtttgccaggcatggagcctgcctccctcctgtggaggtcaggag  
 7601 gaagtgcaggaagtgagtgagtcaggctccttgagctcacacagcaggagaacaagtacaagtaagtaaggtgaaggctcatttccagttcccgcc  
 7701 aaatgcatctaaaaagcagctctgtgtgaccaccataaactctgttaggggatctctaaaaaggagtcaggcttatggggcttttgcaataagtgctgcc  
 7801 ttggtgctcaggaaaagggtttgtgttcacaaaacacaaattccactgc

Fin. 14E

ML332

ML153

— 200

— 116  
— 97— 66.3  
— 55.4— 36.5  
— 31.1

— 21.5

Фиг.15

1 GAGTCCTTGG CCCACCTCTC TCCCACCCGA CTCTGCCGAA AGAAGCACAG AAGCTCAAGC CGCCTCCATG GCCCCAGGAA AGATTCAGGG GAGAGGCCCC

101 ATACAGGGAG CCACTTCAGT TAGACACCTT GGCCAGAATG Met GluLeuThrA spLeuLeuLe uAlaAlaMet LeuLeuAlaV alAlaArgLe uThrLeuSer  
GAGCTGACTG ATTTGCTCCT GGCGGCCATG CTTCCTGCAG TGGCAAGACT AACTCTGTCC

10 20 30  
SerProValA laProAlaCy sAspProArg LeuLeuAsnL ysLeuLeuAr gAspSerHis LeuLeuHisS erArgLeuSe rGlnCysPro AspValAspPro  
201 AGCCCGTAG CTCCTGCCTG TGACCCGAGA CTCCTAAATA AACTGCTGCG TGACTCCAC CTCCTTCACA GCCGACTGAG TCAGTGTCCC GACGTCGACC

40 50 60  
LeuSerIl eProValLeu LeuProAlaV alAspPheSe rLeuGlyGlu TrpLysThrG lnThrGluG1 nSerLysAla GlnAspileL euGlyAlaVal  
301 CTTTGTCTAT CCCTGTTCTG CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CCTGGGAGAA TGGAAAACCC AGACGGAACA GAGCAAGGCA CAGGACATTC TAGGGGCAGT

70 80 90 100  
SerLeuLeu LeuGluGlyV alMetAlaAl aArgGlyGln LeuGluProS erCysLeuSe rSerLeuLeu GlyGlnLeuS erGlyGlnVa lArgLeuLeu  
401 GTCCCTTCTA CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGAGGACAG TTGGAACCTT CCTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGACAGCTTT CTGGGCAGGT TCGCCTCTCT

110 120 130  
LeuGlyAlaL euGlnGlyLe uLeuGlyThr GlnGlyArgT hrThrAlaHi sLysAspPro AsnAlaLeuP heLeuSerLe uGlnGlnLeu LeuArgGlyLys  
501 TTGGGGGCC TGCAGGGCCT CCTAGGAACC CAGGGCAGGA CCACAGCTCA CAAGGACCCC AATGCCCTCT TCTTGAGCTT GCAACAACCT CTTCGGGGAA

140 150 160  
ValArgPh eLeuLeuLeu ValGluGlyP roThrLeuCy sValArgArg ThrLeuProT hrThrAlaVa lProSerSer ThrSerGlnL euLeuThrLeu  
601 AGGTGCGCTT CTGCTTCTG GTAGAAGTC CCACCTCTG TGTCAGACGG ACCCTGCCAA CCACAGCTGT CCCAAGCAGT ACTTCTCAAC TCCTCACACT

170 180 190 200  
AsnLysPhe ProAsnArgT hrSerGlyLe uLeuGluThr AsnPheSerV alThrAlaAr gThrAlaGly ProGlyLeuL euSerArgLe uGlnGlyPhe  
701 AAACAAGTTC CCAACACGGA CTCTCTGGATT GTTGAGAGCG AACTTCAGTG TCACAGCCAG AACTGCTGGC CCTGGACTTC TGAGCAGGCT TCAGGGATTC

210 220 230  
ArgValLysI leThrProG1 yGlnLeuAsn GlnThrSerA rgSerProVa lGlnIleSer GlyTyrLeuA snArgThrHi sGlyProVal AsnGlyThrHis  
801 AGAGTCAAGA TTACTCTCTG TCAGCTAAAT CAAACCTCCA GGTCCCCAGT CCAAATCTCT GGATACCTGA ACAGGACACA CGGACCTGTG AATGGAATC

240 250 260  
GlyLeuPh eAlaGlyThr SerLeuGlnT hrLeuGluAl aSerAspIle SerProGlyA laPheAsnLy sGlySerLeu AlaPheAsnL euGlnGlyGly  
901 ATGGGCTCTT TGCTGGAACC TCACCTCAGA CCCTGGAAGC CTCAGACATC TCGCCCGGAG CTTTCAACAA AGGCTCCCTG GCATTCAACC TCCAGGGTGG

270 280 290 300  
LeuProPro SerProSerL euAlaProAs pGlyHisThr ProPheProP roSerProAl aLeuProThr ThrHisGlyS erProProG1 nLeuHisPro  
1001 ACTTCCTCCT TCTCCAAGCC TTGCTCCTGA TGGACACACA CCCTTCCTC CTTCACCTGC CTTGCCACCC ACCCATGGAT CTCCACCCCA GCTCCACCCC

310 320 330  
LeuPheProA spProSerTh rThrMetPro AsnSerThrA laProHisPr oValThrMet TyrProHisP roArgAsnLe uSerGlnGlu Thr  
1101 CTGTTTCTCTG ACCCTTCCAC CACCATGCCT AACTCTACCG CCCCTCATCC AGTCACAATG TACCCTCATC CCAGGAATTT GTCTCAGGAA ACATAGCGCG

1201 GGCACCTGGC CAGTGAGCGT CTGCAGCTTC TCTCGGGGAC AAGCTTCCCC AGGAAGGCTG AGAGGCAGCT GCATCTGCTC CAGATGTCTT GCTTTCACCT

1301 AAAAGGCCCT GGGGAAGGGA TACACAGCAC TGGAGATTGT AAAATTTTAG GAGCTATTTT TTTTAACTT ATCAGCAATA TTCATCAGAG CAGCTAGCGA

1401 TCTTTGGTCT ATTTTCGGTA TAAATTGAA AATCACTAAT TCT

Фиг. 16A

Фиг. 16B



1 gagtccttggccacacctctctccaccgactctgccgaaagaagcacagaagctcaagccgctccatggccccaggaagattcaggggagaggcccc  
-20 -10  
MetGluLeuThrAspLeuLeuAlaAlaMetLeuLeuAlaValAlaArgLeuThrLeuSer  
101 atacagggagccacttcagtttagacaccttgccagaATGGAGCTGACTGATTTGCTCCTGGCGGCCATGCTTCTTGCAGTGGCAAGACTAACTCTGTCC  
SerProValAlaProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisLeuLeuHisSerArgLeuSerGlnCysProAspValAspPro  
201 AGCCCCGTAGCTCTGCTGTGACCCAGACTCCTAAATAAACTGCTGCTGACTCCACCTCTTCACAGCCGACTGAGTCAGTGTCCCGACGTCGACC  
LeuSerIleProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnSerLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal  
301 CTTGTCTATCCCTGTTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCCTGGGAGAATGGAAAACCCAGACGGAACAGCAAGGCACAGGACATTCTAGGGGCAGT  
SerLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGluProSerCysLeuSerSerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu  
401 GTCCCTTCTACTGGAGGGAGTGATGGCAGCAGGACAGTTGGAACCTCTGCTCTCATCCCTCTGGGACAGCTTTCTGGGCAGGTTCCGCTCTCT  
LeuGlyAlaLeuGlnGlyLeuLeuGlyThrGlnLeuProLeuGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaLeuPheLeuSerLeuGlnGlnLeu  
501 TTGGGGGCCCTGCAGGCGCTCTAGGAACCCAGCTTCTCTACAGGGCAGGACCACAGCTCAAGAAGACCCCAATGCCTCTTCTTGAGCTTGAACAAC  
LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuValGluGlyProThrLeuCysValArgArgThrLeuProThrThrAlaValProSerSerThrSerGln  
601 TGCTTCGGGAAAGGTGCGCTTCTGCTTCTGGTAGAAGGTCCACCTCTGTGTGACAGCGACCTGCCAACCACAGCTGTCCCAAGCAGTACTTCTCA  
LeuLeuThrLeuAsnLysPheProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheSerValThrAlaArgThrAlaGlyProGlyLeuLeuSerArg  
701 ACTCCTCACACTAAACAAGTTCCTCAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACGAATCTCAGTGTACAGCCAGAATCTGTCGCTTCTGAGCAGG  
210 220 230  
LeuGlnGlyPheArgValLysIleThrProGlyGlnLeuAsnGlnThrSerArgSerProValGlnIleSerGlyTyrLeuAsnArgThrHisGlyProVal  
801 CTTCAGGGATTGAGTCAAGATTACTCTGGTCAGCTAAATCAAACCTCCAGGTCCCCAGTCCAAATCTCTGGATACCTGAACAGGACACAGGACCTG  
AsnGlyThrHisGlyLeuPheAlaGlyThrSerLeuGlnThrLeuGluAlaSerAspIleSerProGlyAlaPheAsnLysGlySerLeuAlaPheAsn  
901 TGAATGGAATCATGGGCTCTTTGCTGGAACCTCACTTCAGACCTGGAAGCCTCAGACATCTCGCCCGAGCTTTCAACAAAGGCTCCCTGGCATTCAA  
LeuGlnGlyGlyLeuProProSerProSerLeuAlaProAspGlyHisThrProPheProProSerProAlaLeuProThrThrHisGlySerProPro  
1001 CCTCCAGGGTGGACTTCTCTCTTCTCAAGCCTTGCTCTGTATGGACACACACCTTCCCTCTTCACTGCCTTGGCCACCCCATGGATCTCCACCC  
GlnLeuHisProLeuPheProAspProSerThrThrMetProAsnSerThrAlaProHisProValThrMetTyrProHisProArgAsnLeuSerGlnGlu  
1101 CAGTCCACCCCTGTTTCTGACCTTCCACCACCATGCTCTAATCTACCGCCCTCATCCAGTCACAATGTACCTCATCCAGGAATTTGTCTCAGG  
Thr  
1201 AAACATAGCgcggggactggccagtgagcgtctgcagcttctcggggacaagcttccccaggaaggctgagaggcagctgcatctgctccagatggt  
1301 ctgctttcacctaaaagggcctgggggaagggatcacagcactggagattgtaaaatttttaggagctattttttttaacctatcagcaatattcatcag  
1401 agcagctagcgatcttttggtctattttcggtataaatttgaaatcactaa  
1501 aa

Fun 17A

Fun 17B

hML3	1	S	P	A	P	A	C	D	L	R	V	L	S	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	E	V	H	P	L	P	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E	
mML3	1	S	P	V	A	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	L	L	H	S	R	L	S	Q	C	P	D	V	D	P	L	S	I	P	V	L	L	P	A	V	D	F	S	L	G	E

hML3	51	W	K	T	Q	M	E	E	T	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	T	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	G	P	T	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L
mML3	51	W	K	T	Q	T	E	Q	S	K	A	Q	D	I	L	G	A	V	S	L	L	L	E	G	V	M	A	A	R	G	Q	L	E	P	S	C	L	S	S	L	L	G	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L

hML3	101	L	G	A	L	Q	S	L	L	G	T	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	I	F	L	S	F	Q	H	L	L	R	G	K	D	F	W	I	V	G	D	K	L	H	C	L
mML3	101	L	G	A	L	Q	G	L	L	G	T	Q	L	P	L	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	N	A	L	F	L	S	L	Q	Q	L	L	R	G	K	D	F	W	I	V	G	D	E	L	Q	C	H

hML3	151	S	Q	N	Y	W	L	W	A	S	E	V	A	A	G	I	Q	S	Q	D	S	W	S	A	E	P	N	L	Q	V	P	G	P	N	P	R	I	P	E	Q	D	T	R	T	L	E	W	N	S	W	
mML3	151	S	Q	N	C	W	P	W	T	S	E	Q	A	S	G	I	Q	S	Q	D	Y	S	W	S	A	K	S	N	L	Q	V	P	S	P	N	L	W	I	P	E	Q	D	T	R	T	C	E	W	N	S	W

hML3	200	T	L	S	W	T	L	T	Q	D	P	R	S	P	G	H	F	L	R	N	I	R	H	R	L	P	A	T	Q	P	P	A	W	I	F	S	F	P	N	P	S	S	Y	W	T	V	Y	A	L	P	S
mML3	201	A	L	C	W	N	L	T	S	D	P	G	S	L	R	H	L	A	R	S	F	Q	Q	R	L	P	G	I	Q	P	P	G	W	T	S	S	F	S	K	P	C	S									

hML3 250 STHLAHPCGPAPPPAS

Fun 18

m-ML 1 S P V A P A C D P R L L N K L L R D S H L L H S R L S Q C P D V D P L S I P V L L P A V D F S L G E  
p-ML 1 S P A P P A C D P R L L N K L L R D S H V L H G R L S Q C P D I N P L S T P V L L P A V D F T L G E  
h-ML 1 S P A P P A C D L R V L S K L L R D S H V L H S R L S Q C P E V H P L P T P V L L P A V D F S L G E

m-ML 51 W K T Q T E Q S K A Q D I L G A V S L L L E G V M A A R G Q L E P S C L S S L L G Q L S G Q V R L L  
p-ML 51 W K T Q T E Q T K A Q D V L G A T T L L L E A V M T A R G Q V G P P C L S S L L V Q L S G Q V R L L  
h-ML 51 W K T Q M E E T K A Q D I L G A V T L L L E G V M A A R G Q L G P T C L S S L L G Q L S G Q V R L L

m-ML 101 L G A L Q G L L G T Q L P L Q G R T T A H K D P N A L F L S L Q Q L L R G K V R F L L L V E G P T L  
p-ML 101 L G A L Q D L L G M Q L P P Q G R T T A H K D P S A I F L N F Q Q L L R G K V R F L L L V V G P S L  
h-ML 101 L G A L Q S L L G T Q L P P Q G R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R G K V R F L M L V G G S T L

m-ML 151 C V R R T L P T T A V P S S T S Q L L T L N K F P N R T S G L L E T N E S V T A R T A G P G L L S R  
p-ML 151 C A K R A P P A I A V P S S T S P F H T L N K L P N R T S G L L E T N E S I S A R T T G S G F L K R  
h-ML 151 C V R R A P P T T A V P S R T S L V L T L N E L P N R T S G L L E T N E T A S A R T T G S G L L K W

m-ML 201 L Q G F R V K I T P G Q L N Q T S R S P V Q I S G Y L N R T H G P V N G T H G L F A G T S L Q T L E  
p-ML 201 L Q A F R A K I - P G L L N Q T S R S L D Q I P G H Q N G T H G P L S G I H G L F P G P Q P G A L G  
h-ML 201 Q Q G F R A K I - P G L L N Q T S R S L D Q I P G Y L N R I H E L L N G T R G L F P G P S R R T L G

m-ML 251 A S D I S P G A F N K G S L A F N L Q G G L P P S P S L A P D G H - T P F P P S P A L P T I H G S P  
p-ML 250 A P D I P P A T S G M G S R P T Y L Q P G E S P S P A H P S P G R Y T L F S P S P T S P S - - P T  
h-ML 250 A P D I S S G T S D T G S L P P N L Q P G Y S P S P T H P P T G Q Y T L F P L P P T L P T - - P V

m-ML 300 P Q L H P L F P D P S I T M P N S T A P H P V T M Y P H P R N L S Q E T  
p-ML 297 V Q L Q P L L P D P S A I T P N S T S P L L F A A H P H F Q N L S Q E E  
h-ML 297 V Q L H P L L P D P S A P T P T P T S P L L N T S Y T H S Q N L S Q E G

Pur.19

10 20 30  
SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro  
1 AGCCCGGCTCCTCCTGTGACCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCTGACTCCCATGTCTTCACGGCAGATGAGCCAGTGCCACAGATTAAAC

40 50 60  
LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr  
101 CTTTGTCACACCTGTCTGTGCTGTGACTTCACCTTGGGAGATGGAAAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGATGTCTCGGAGCCAC

70 80 90 100  
ThrLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu  
201 AACCTTCTGTGAGGACAGTGATGACAGCAGGGGACAAAGTGGGACCCCTTGCCTCTCATCCTGCTGGTGCAGCTTTCTGGACAGGTTCGCTCCTC

110 120 130  
LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeu  
301 CTGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGAATGCAGCTTCCTCCACAGGAAGGACCACAGCTCACAAGGATCCAGTGCCATCTTCTGAATTCACAAAC

140 150 160  
LeuArgGlyLysValArgPheLeuLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerPro  
401 TGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCTGCTCCTGTAGTGGGGCCCTCCTCTGTGCCAAGAGGGCCCCACCCGCCATAGCTGTCCCGAGCAGCAGCTCTCC

170 180 190 200  
PheHisThrLeuAsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArg  
501 ATTCCACACACTGAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTTGGAGACAACTCCAGTATCTCAGCCAGAATACTGGCTCTGGATTTCTCAAGAGG

210 220 230  
LeuGlnAlaPheArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSer  
601 CTGCAGGCATTGAGACCAAGATTCTGGTCTGCTGAACCAAACTCCAGTCCCTAGACCAAAATCCCTGGACACCAGAAATGGGACACACGGACCTTGA

240 250 260  
GlyIleHisGlyLeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeu  
701 GTGGAATTCATGGACTCTTTCTGGACCCCAACCCGGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGCCCACTACCT

270 280 290 300  
GlnProGlyGluSerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProSerProThrValGlnLeuGln  
801 CCAGCTGGAGAGTCTCTTCCCCAGCTCACCTTCTCTGGACGATACACTCTCTCTCTCTCCTTCCACCCACCTCGCCCTCCCCACAGTCCAGTCCAG

310 320 330  
ProLeuLeuProAspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGlu  
901 CCTCTGCTTCTGACCCCTCTGCGATCACACCAACTCTACAGTCTCTCTATTTGCAGCTCACCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAG

1001 GTGCTCAGACCTGCCAATTTCAGCA

Pur.20A

Pur.20B



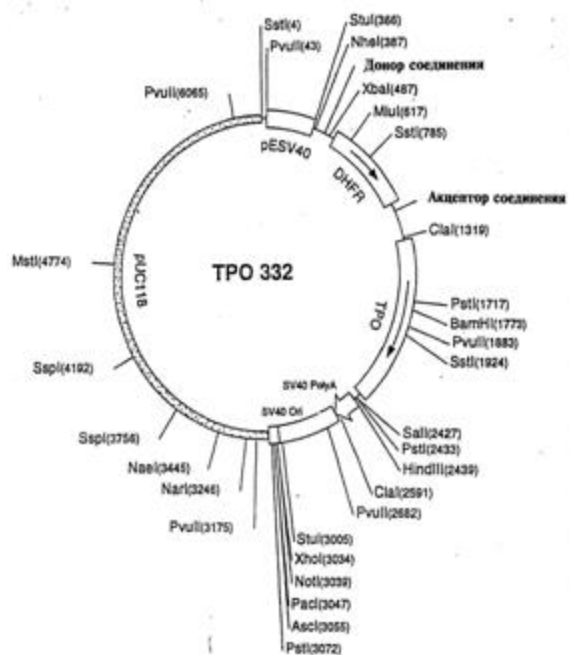
10 20 30  
 SerProAlaProProAlaCysAspProArgLeuLeuAsnLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisGlyArgLeuSerGlnCysProAspIleAsnPro  
 1 AGCCCGGCTCCTCTGCTGTGACCCCGACTCCTAAATAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCTTCACGGCAGACTGAGCCAGTGGCCAGACATTAACC  
 40 50 60  
 LeuSerThrProValLeuLeuProAlaValAspPheThrLeuGlyGluTrpLysThrGlnThrGluGlnThrLysAlaGlnAspValLeuGlyAlaThr  
 101 CTTTGTCACACCTGTCTGTGCTGTGTGGACTTCACCTTGGGAGAATGGAACCAACCCAGACGGAGCAGACAAAGGCACAGGATGTCTGGGAGCCAC  
 70 80 90 100  
 ThrLeuLeuLeuGluAlaValMetThrAlaArgGlyGlnValGlyProProCysLeuSerSerLeuLeuValGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeu  
 201 AACCTTCTGTGGAGGAGTGTGACAGCAGGGGACAAGTGGGACCCCTTGCTCTCATCCCTGCTGGTGCAGCTTCTTGGACAGTTCCGCTCCCTC  
 110 120 130  
 LeuGlyAlaLeuGlnAspLeuLeuGlyMetGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProSerAlaIlePheLeuAsnPheGlnGlnLeuLeuArgGlyLys  
 301 CTCGGGGCCCTGCAGGACCTCCTTGAATGCAGGAAGGACCACAGCTCACAAGGATCCAGTGCCATCTTCTGAACTTCCAACAACCTGCTCCGAGGAA  
 140 150 160  
 ValArgPheLeuLeuLeuValValGlyProSerLeuCysAlaLysArgAlaProProAlaIleAlaValProSerSerThrSerProPheHisThrLeu  
 401 AGGTGCGTTTCTGCTCTCTGTAGTGGGGCCCTCCCTCTGTGCCAAGAGGGCCCCACCGCCATAGCTGTCCCGAGCAGCAGCTTCCATTCCACACACT  
 170 180 190 200  
 AsnLysLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnSerSerIleSerAlaArgThrThrGlySerGlyPheLeuLysArgLeuGlnAlaPhe  
 501 GAACAAGCTCCCAACAGGACCTCTGGATTGTGGAGACAACTCCAGTATCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGATTCTCAAGAGGCTGCAGGCATTCT  
 210 220 230  
 ArgAlaLysIleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyHisGlnAsnGlyThrHisGlyProLeuSerGlyIleHisGly  
 601 AGAGCCAAGATTCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTAGACCAATCCCTGGACACCAGAATGGGACACACGGACCCCTTGTAGTGAATTCATG  
 240 250 260  
 LeuPheProGlyProGlnProGlyAlaLeuGlyAlaProAspIleProProAlaThrSerGlyMetGlySerArgProThrTyrLeuGlnProGlyGlu  
 701 GACTCTTCTGGAGCCCCAACCCGGGGCCCTCGGAGCTCCAGACATTCCTCCAGCAACTTCAGGCATGGGCTCCCGGCCAACCTACCTCCAGCTGGAGA  
 270 280 290 300  
 SerProSerProAlaHisProSerProGlyArgTyrThrLeuPheSerProSerProThrSerProThrValGlnLeuGlnProLeuLeuPro  
 801 GTCTCTTCCCGAGCTCACCTTCTCTGGACGATACACTCTCTCTCTCTCACCACCTCGCCCTCCCCCAGTCCAGCTCCAGCTCTGCTTCTCT  
 310 320  
 AspProSerAlaIleThrProAsnSerThrSerProLeuLeuPheAlaAlaHisProHisPheGlnAsnLeuSerGlnGluGlu  
 901 GACCCCTCTGGATCACACCAACTCTACCAGTCTCTTCTATTGTCAGCTCACCTCATTTCCAGAACCTGTCTCAGGAAGAGTAAGTGCTCAGACCC  
 1001 TGCCAACCTTCAGCA

Plin. 21A

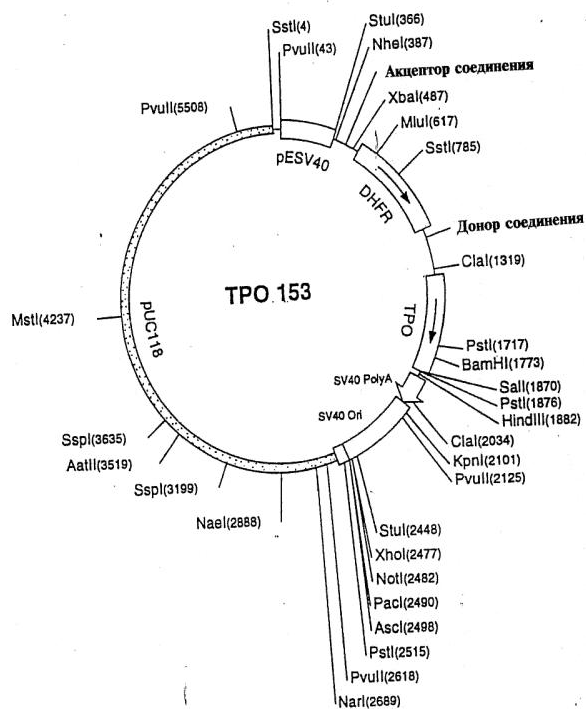
Plin. 21B

pML	1	S	P	A	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	G	R	L	S	Q	C	P	D	I	N	P	L	S	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	T	L	G	E	
pML2	1	S	P	A	P	A	C	D	P	R	L	L	N	K	L	L	R	D	S	H	V	L	H	G	R	L	S	Q	C	P	D	I	N	P	L	S	T	P	V	L	L	P	A	V	D	F	T	L	G	E	
pML	51	W	K	T	Q	T	E	Q	T	K	A	Q	D	V	L	G	A	T	T	L	L	L	E	A	V	M	T	A	R	G	Q	V	G	P	P	C	L	S	S	L	L	V	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L
pML2	51	W	K	T	Q	T	E	Q	T	K	A	Q	D	V	L	G	A	T	T	L	L	L	E	A	V	M	T	A	R	G	Q	V	G	P	P	C	L	S	S	L	L	V	Q	L	S	G	Q	V	R	L	L
pML	101	L	G	A	L	Q	D	L	L	G	M	Q	L	P	P	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	S	A	I	F	L	N	F	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	L	V	V	G	P	S	L
pML2	101	L	G	A	L	Q	D	L	L	G	M	-	-	-	-	Q	G	R	T	T	A	H	K	D	P	S	A	I	F	L	N	F	Q	Q	L	L	R	G	K	V	R	F	L	L	L	V	V	G	P	S	L
pML	151	C	A	K	R	A	P	P	A	I	A	V	P	S	S	T	S	P	F	H	T	L	N	K	L	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	S	S	I	S	A	R	T	T	G	S	G	F	L	K	R
pML2	147	C	A	K	R	A	P	P	A	I	A	V	P	S	S	T	S	P	F	H	T	L	N	K	L	P	N	R	T	S	G	L	L	E	T	N	S	S	I	S	A	R	T	T	G	S	G	F	L	K	R
pML	201	L	Q	A	F	R	A	K	I	P	G	L	L	N	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	H	Q	N	G	T	H	G	P	L	S	G	I	H	G	L	F	P	G	P	Q	P	G	A	L	G	A
pML2	197	L	Q	A	F	R	A	K	I	P	G	L	L	N	Q	T	S	R	S	L	D	Q	I	P	G	H	Q	N	G	T	H	G	P	L	S	G	I	H	G	L	F	P	G	P	Q	P	G	A	L	G	A
pML	251	P	D	I	P	P	A	T	S	G	M	G	S	R	P	T	Y	L	Q	P	G	E	S	P	S	P	A	H	P	S	P	G	R	Y	T	L	F	S	P	S	P	T	S	P	S	P	T	V	Q	L	Q
pML2	247	P	D	I	P	P	A	T	S	G	M	G	S	R	P	T	Y	L	Q	P	G	E	S	P	S	P	A	H	P	S	P	G	R	Y	T	L	F	S	P	S	P	T	S	P	S	P	T	V	Q	L	Q
pML	301	P	L	L	P	D	P	S	A	I	T	P	N	S	T	S	P	L	L	F	A	A	H	P	H	F	Q	N	L	S	Q	E	E																		
pML2	297	P	L	L	P	D	P	S	A	I	T	P	N	S	T	S	P	L	L	F	A	A	H	P	H	F	Q	N	L	S	Q	E	E																		

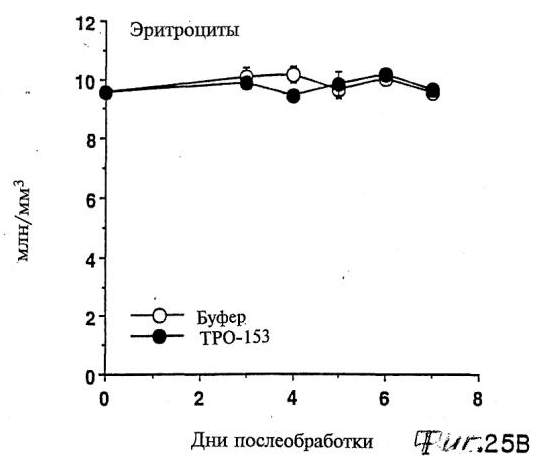
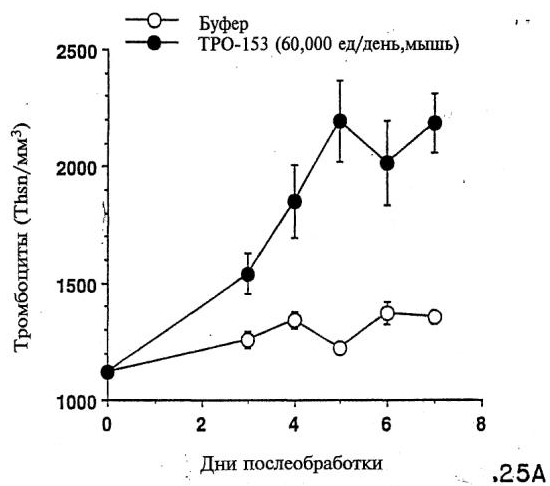
Plin. 22

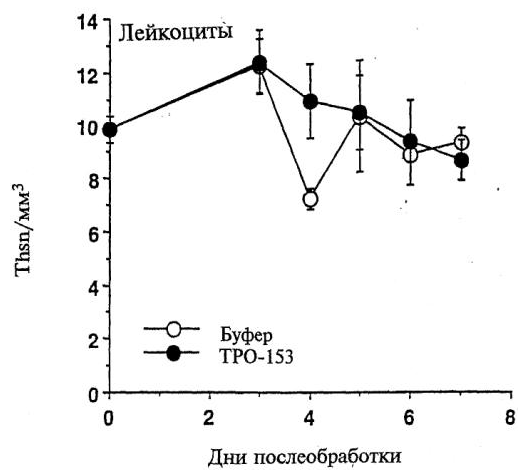


Фиг. 23

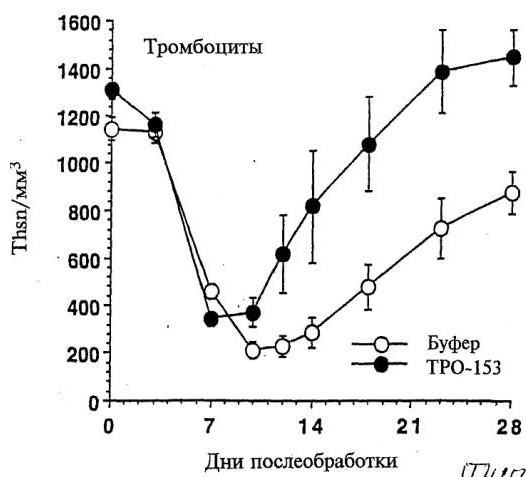


Фиг. 24

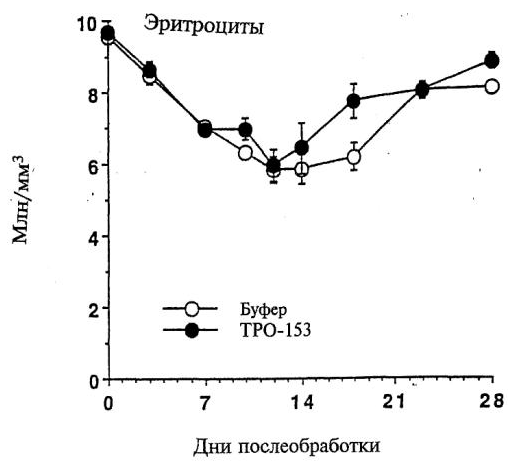




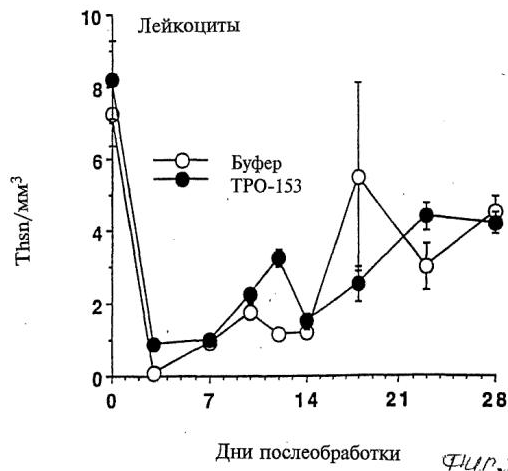
25C



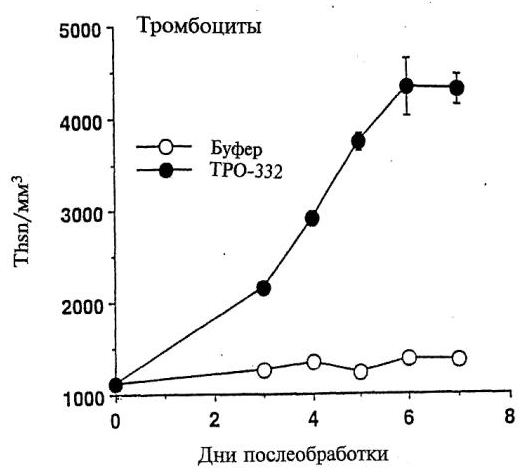
Фиг.26А



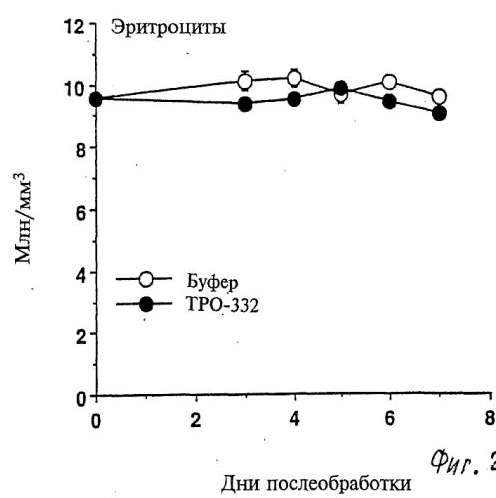
26B



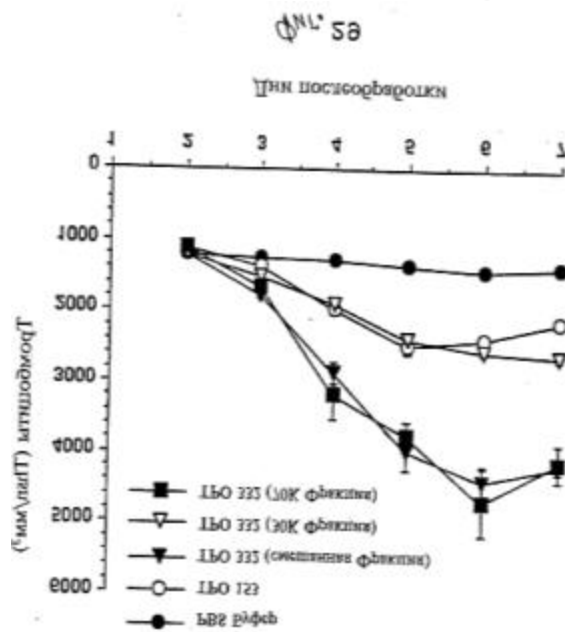
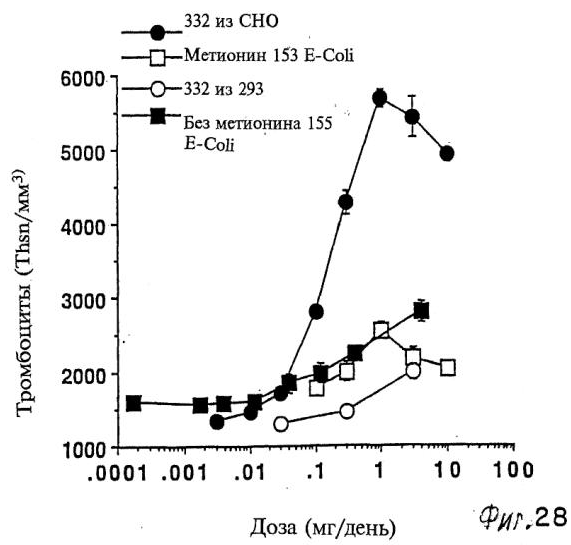
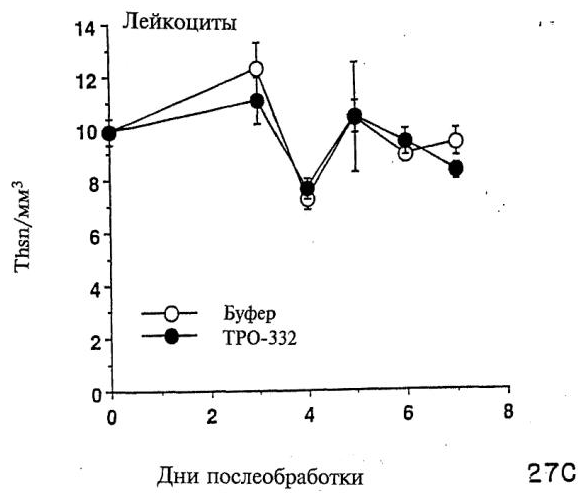
Фиг. 26C

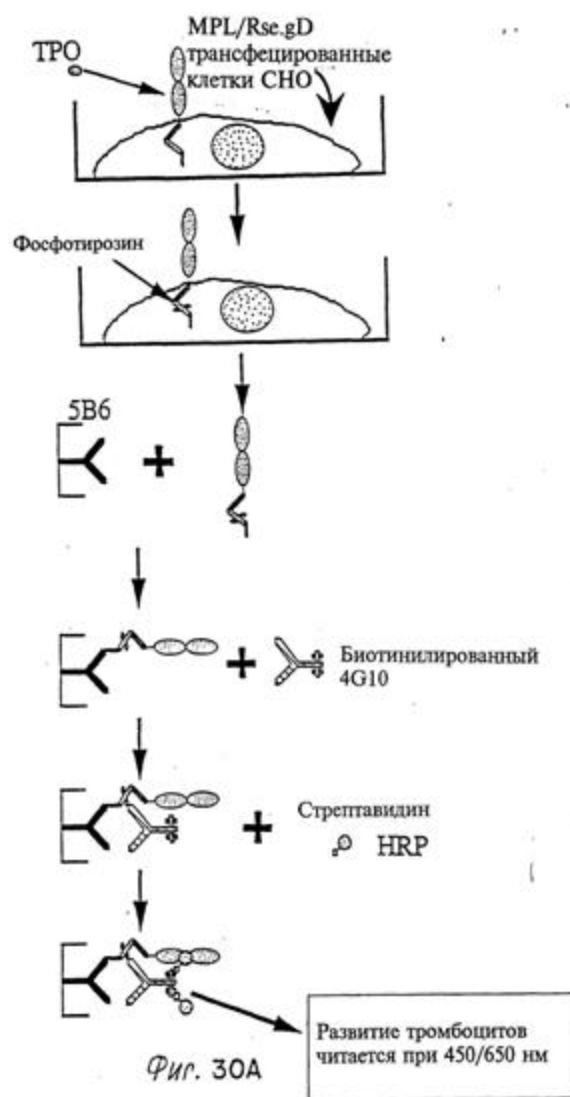


27A

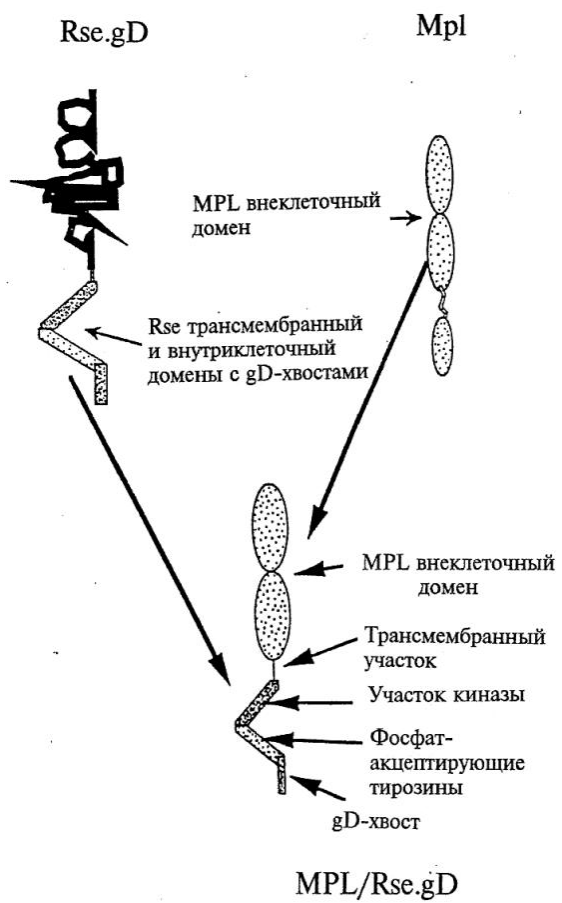


Фиг. 27B









Фиг. 30В



scrFI nlaIV  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI  
 apyI[dcM+]  
 bsaJI  
 [dcM+]

sfaNI  
 nsII/avaIII  
 nlaIII  
 sphI  
 nspI  
 nspHI  
 ppulOI

141 GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC  
 CACACCTTTC AGGGGTCCGA GGGGTCGTCC GTCTTCATAC GTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG

nlaIII  
 styI  
 ncoI  
 bslI dsaI  
 aciI  
 aciI foki  
 aciI bsrI aciI  
 aciI bsaJI  
 211 ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCAGTTC CGCCCATTTCT CCGCCCCATG  
 TATCAGGGCG GGGATTGAGG CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGGTAC

fnu4HI  
 bglI  
 sfiI  
 haeIII/palI  
 mnlI mnlI ddeI  
 haeIII/palI bsaJI mnlI aluI  
 mnlI bsaJI aciI haeIII/palI  
 281 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG  
 CGACTGATTA AAAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA CTCGATAAGG TCTTCATCAC

# Фиг. 32B

rmaI  
 styI  
 bsaJI  
 blnI  
 avrII  
 haeIII/palI  
 stuI  
 haeI  
 mnlI  
 mnlI maeI

haeIII/palI  
 aluI  
 rmaI  
 maeI  
 nheI  
 aluI

haeIII/palI  
 mcrI  
 eagI/xmaIII/ecI XI  
 eaeI  
 cfrI  
 mspI  
 hpaII

351 AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAAGCTA GCTTATCCGG  
 TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC GTTTTTTCGAT CGAATAGGCC

tfiI  
 hinFI  
 aciI  
 thaI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I

scrFI  
 nciI  
 mspI  
 hpaII  
 dsaV  
 cauII

maeII  
 rsaI  
 maeIII  
 csp6I scfI

401 CCGGGAACGG TGCATTGGAA CGCGGATTCC CCGTGCCAAG AGTGACGTAA GTACCGCCTA TAGAGCGATA  
 GGCCCTTGCC ACGTAACCTT GCGCCTAAGG GGCACGGTTC TCACTGCATT CATGGCGGAT ATCTCGCTAT  
 ^splice donor

fnu4HI  
 bbvI  
 nspBII  
 aciI  
 nlaIII taqI  
 sfaNI  
 pflMI  
 bslI

471 AGAGGATTTT ATCCCCGCTG CCATCATGGT TCGACCATTG AACTGCATCG TCGCCGTGTC CAAAATATG  
 TCTCCTAAAA TAGGGGCGAC GGTAGTACCA AGCTGGTAAC TTGACGTAGC AGCGGCACAG GGTTTTATAC  
 DHFR ATG^

# Фиг. 32C

haeIII/palI  
 haeI  
 scrFI  
 mvaI bsrBI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI aciI  
 bsmAI apyI[dcM+] xmnI rsaI  
 bsaI bsaJI mnlI ddeI asp700 csp6I  
 541 GGGATTGGCA AGAACGGAGA CCTACCCTGG CCTCCGCTCA GGAACGAGTT CAAGTACTTC CAAAGAATGA  
 CCCTAACCGT TCTTGCTCT GGATGGGACC GGAGGCGAGT CTTGCTCAA GTTCATGAAG GTTCTTACT  
 scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI  
 apyI[dcM+]  
 sexAI ddeI  
 eco57I  
 mboII tfiI  
 earI/ksp632I hinfI  
 mnlI alwNI hphI  
 611 CCACAACCTC TTCAGTGGAA GGTAACAGA ATCTGGTGAT TATGGGTAGG AAAACCTGGT TCTCCATTCC  
 GGTGTTGGAG AAGTCACCTT CCATTGTCT TAGACCACTA ATACCCATCC TTTTGGACCA AGAGGTAAGG  
 tfiI tru9I  
 hinfI mseI mseI ddeI  
 mboII taqI ahaIII/draI aseI/asnI/vspI bslI mnlI  
 681 TGAGAAGAAT CGACCTTTAA AGGACAGAAT TAATATAGTT CTCAGTAGAG AACTCAAAGA ACCACCACGA  
 ACTCTTCTTA GCTGGAAATT TCCTGTCTTA ATTATATCAA GAGTCATCTC TTGAGTTTCT TGGTGGTGCT

# Фиг.32D

sstI  
 sacI  
 hgiJII  
 hgiAI/aspHI  
 ecl136II  
 bsp1286  
 bsiHKA  
 bmyI  
 banII  
 aluI  
 bstXI  
 fokI  
 sfaNI  
 mseI  
 tru9I  
 aflIII/bfrI  
 mspI  
 hpaII  
 bsaWI  
 751 GGAGCTCATT TTCTTGCCAA AAGTTTGGAT GATGCCTTAA GACTTATTGA ACAACCGGAA TTGGCAAGTA  
 CCTCGAGTAA AAGAACGGTT TTCAAACCTA CTACGGAATT CTGAATAACT TGTGGCCTT AACCGTTCAT  
 haeIII/palI  
 haeI  
 scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsaV  
 tfiI  
 dsaV  
 bstNI  
 nlaIII  
 bstNI  
 ddeI  
 accI nlaIII mnlI  
 821 AAGTAGACAT GGTTTGGATA GTCGGAGGCA GTTCTGTTTA CCAGGAAGCC ATGAATCAAC CAGGCCACCT  
 TTCATCTGTA CCAAACCTAT CAGCCTCCGT CAAGACAAAT GGTCTTCGG TACTTAGTTG GTCCGGTGGA

# Фиг.32E

nlaIII  
 sau3AI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+]  
 pleI  
 hinfi  
 maeIII alwI[dam-] apoI maeIII  
 dpnII[dam-] aflIII  
 891 TAGACTCTTT GTGACAAGGA TCATGCAGGA ATTTGAAAGT GACACGTTTT TCCCAGAAAT TGATTTGGGG  
 ATCTGAGAAA CACTGTTCTT AGTACGTCCT TAAACTTTCA CTGTGCAAAA AGGGTCTTTA ACTAAACCCC

hgaI  
 hinII/acyI  
 ahaII/bsaHI  
 scrFI  
 mvaI mnlI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI ecoNI  
 apyI[dcm+] mnlI  
 mnlI bsaJI bslI ddeI  
 961 AAATATAAAC CTCTCCAGGA ATACCCAGGC GTCCTCTCTG  
 TTTATATTTG GAGAGGGTCT TATGGGTCCG CAGGAGAGAC

### Фиг.32F

scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI  
 apyI[dcm+]  
 sau96I  
 avaII  
 asuI mnlI sfaNI accI mboII mboII sfaNI  
 1001 AGGTCCAGGA GGAAAAAGGC ATCAAGTATA AGTTTGAAGT CTACGAGAAG AAAGACTAAC AGGAAGATGC  
 TCCAGGTCTT CCTTTTCCG TAGTTCATAT TCAAACCTCA GATGCTCTTC TTTCTGATTG TCCTTCTACG  
 ^END DHFR

nlaIII  
 styI  
 ncoI  
 dsal  
 ppulOI  
 mnlI aluI nsII/avaIII bsaJI  
 1071 TTTCAAGTTC TCTGCTCCCC TCCTAAAGCT ATGCATTTT ATAAGACCAT GGGACTTTTG  
 AAAGTTCAAG AGACGAGGGG AGGATTTCTGA TACGTAAAAA TATTCTGGTA CCCTGAAAAAC

### Фиг.32G

styI  
 bsaJI  
 sau3AI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+]  
 dpnII[dam-]  
 alwI[dam-]  
 bstYI/xhoII  
 fnu4HI  
 aciI  
 thaI  
 fnuDII/mvnI tru9I  
 bstUI mseI  
 bsh1236I aseI/asnI/vspI  
 1131 CTGGCTTTAG ATCCCTTGG CTCGTTAGA ACGCGGCTAC AATTAATACA TAACCTTATG TATCATACAC  
 GACCGAAATC TAGGGGAACC GAAGCAATCT TGCGCCGATG TTAATTATGT ATTGGAATAC ATAGTATGTG  
 sau96I  
 avaiI  
 asuI  
 scrFI  
 mvaI  
 ecoRII  
 dsaV  
 bstNI  
 apyI[dcn+]  
 maeIII  
 hphI scfI foki bslI bsaJI  
 1201 ATACGATTTA GGTGACACTA TAGATAACAT CCACTTTGCC TTTCTCTCCA CAGGTGTCCA CTCCAGGTC  
 TATGCTAAAT CCACTGTGAT ATCTATTGTA GGTGAAACGG AAAGAGAGGT GTCCACAGGT GAGGGTCCAG

# Фиг. 32H

scrFI  
 nciI  
 mspI  
 hpaII  
 dsaV  
 xmaI/pspAI  
 smaI  
 scrFI  
 nciI  
 dsaV  
 cauII  
 bsaJI  
 avaiI  
 sau3AI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+]  
 dpnII[dam-]  
 pleI nlaIV cauII  
 hinfI bstYI/xhoII  
 scfI tagI rmaI bamHI bsaJI  
 aluI pstI salI maeI alwI[dam-]  
 mnII hindIII bspMI hincII/hindII alwI[dam-]  
 bsaJI ddeI bsgI accI xbaI mnII bsaJI  
 1271 CAACTGCACC TCGGTTCTAA GCTTCTGCAG GTCGACTCTA GAGGATCCCC  
 GTTGACGTGG AGCCAAGATT CGAAGACGTC CAGCTGAGAT CTCCTAGGGG

# Фиг. 32I

```

                                sau96I
                                aciI   haeIII/palI
                                fnu4HI  asuI
                                bglI   nlaIII
                                sfiI   styI
                                eaeI   ncoI
                                cfrI   dsaI
                                aluI
                                fnu4HI
                                maeIII
                                bbsI
                                apoI   claI/bsp106 bsaJI
                                taqI   haeIII/palI
                                ecoRI
                                GGGGAATTCA ATCGATGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
                                CCCCTTAAGT TAGCTACCGG CGGTACCGGG TTGAACAAAT AACGTCGAAT ATTACCAATG TTTATTTCGT
                                ^sv40 early poly A

                                rmaI
                                bsmI maeI
                                sfaNI apoI
                                1391 ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTCCTACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACATCAT
                                TATCGTAGTG TTAAAGTGT TTATTTCGTA AAAAAAGTGA CGTAAGATCA ACACCAACA GGTTCGAGTA

```

### Фиг. 32J

```

                                sau3AI
                                mboI/ndeII[dam-]
                                dpnI[dam+]
                                dpnII[dam-]
                                pvuI/bspCI
                                mcrI
                                taqI[dam-] tru9I
                                claI/bsp106[dam-]
                                sau3AI mseI
                                mboI/ndeII[dam-]
                                dpnI[dam+] xmnI
                                dpnII[dam-] aseI/asnI/vspI
                                nlaIII alwI[dam-] asp700
                                1461 CAATGTATCT TATCATGTCT GGATCGATCG GGAATTAATT
                                GTTACATAGA ATAGTACAGA CCTAGCTAGC CCTTAATTAA
                                sv40 origin^

```

```

                                haeIII/palI
                                haeI
                                styI
                                fnu4HI ncoI
                                bbsI dsaI
                                hinPI bsaJI
                                hhaI/cfoI nlaIII
                                mnII mnII
                                rsal
                                csp6I
                                nlaIV
                                kpnI
                                hgiCI
                                banI
                                asp718 mnII
                                acc65I ddeI aciI
                                1501 CGGCGCAGCA CCATGGCCTG AAATAACCTC TGAAAGAGGA ACTTGGTTAG GTACCTTCTG AGGCGGAAAG
                                GCCGCGTCGT GGTACCGGAC TTTATTGGAG ACTTTCCTCT TGAACCAATC CATGGAAGAC TCCGCTTTC

```

### Фиг. 32K

ФИГ. 32L

1571 AACCAGCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG TGTGGAAAGT CCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC  
TTGGTCGACA CCTTACACAC AGTCAATCCC ACACCTTTCA GGGGTCCGAG GGGTCGTCCG TCTTCATACG

1641 AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT  
TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT CCACACCTTT CAGGGGTCCG AGGGGTCGTC CGTCTTCATA

1711 GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAACTC CGCCCTATCC GCCCCTAACT  
CGTTTTCGTAC GTAGAGTTAA TCAGTCGTTG GTATCAGGGG GGGGATTGAG GCGGGTAGGG CGGGGATTGA

1781 CCGCCAGTT CCGCCATTC TCCGCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG  
GGCGGGTCAA GGCGGGTAAG AGGCGGGGTA CCGACTGATT AAAAAAATA AATACGTCTC

1841 GCCGAGGCCG CCTCGGCCCT TGAGCTATTC CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC  
CGGCTCCGGC GGAGCCGGAG ACTCGATAAG GTCTTCATCA CTCCTCCGAA AAAACCTCCG

## ФИГ. 32М



```

          aciI          hinPI
          haeIII/palI   hhaI/cfoI
          mcrI          thaI
          eagI/xmaIII/ecI XI fnuDII/mvnI
          taqI eaeI          bstUI          bspMI
          xhoI notI          hinPI          scfI
          paeR7I cfrI   tru9I   hhaI/cfoI   tru9I   pstI
          avaI   fnu4HI   pacI   ascI   ahaIII/draI
          rmaI          mnlI   aciI   mseI   tru9I   bsh1236I   mseI   bsgI
          maeI          aluI   maeIII   bsrBI   fnu4HI   mseI   bssHII   swaI   sse8387I
1901 CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT GTTACCTCGA GCGGCCGCTT AATTAAGGCG CGCCATTAA ATCCTGCAGG
      GATCCGAAAA CGTTTTTCGA CAATGGAGCT CGCCGGCGAA TTAATTCCGC GCGGTAAATT TAGGACGTCC
          ^start pUC118
          ^linearization linker inserted into HpaI site

```

```

          scrFI
          mvaI
          ecoRII
          dsaV
          bstNI
          maeIII          cfrI          maeIII          apyI[dcn+]          tru9I
          aluI   bsrI          maeII   bsrI          bsaJI   maeIII   mseI
1971 TAACAGCTTG GCACTGGCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT
      ATTGTCGAAC CGTGACCGGC AGCAAAATGT TGCAGCACTG ACCCTTTTGG GACCGCAATG GGTGAATTA

```

### Фиг.32N

```

          sau3AI
          sau96I          mboI/ndeII[dan-]
          haeIII/palI
          asuI          dpnI[dan+]
          aluI          mnlI          dpnII[dan-]
          fnu4HI          pvuII          mboII   aciI   pvuI/bspCI
          bbvI   foki          nspBII          earI/ksp632I   mcrI
2041 CGCCTTGAG CACATCCCCC CTCGCCAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCAGT
      GCGGAACGTC GTGTAGGGGG GAAGCGGTCG ACCGCATTAT CGCTTCTCCG GCGGTGGCTA

```

```

          hinPI
          hhaI/cfoI
          nlaIV
          narI
          kasi
          hinII/acyI
          hgiCI
          haeII          aciI
          banI   sfaNI
          bglI          ahaII/bsaHI          sfaNI
2101 CGCCCTTCCC AACAGTTGCG TAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC
      GCGGAAGGGG TTGTCAACGC ATCGGACTTA CCGCTTACCG CGGACTACGC CATAAAAGAG GAATGCGTAG

```

### Фиг.32O

hinPI  
 thaI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI scfI hinPI  
 bsh1236I hhaI/cfoI  
 rsaI hhaI/cfoI fnu4HI  
 csp6I bslI aciI  
 2171 TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATACGTCAAA GCAACCATAG TACGCGCCCT GTAGCGGCGC  
 ACACGCCATA AAGTGTGGCG TATGCAGTTT CGTTGGTATC ATGCGCGGGA CATCGCCGCG  
 fnu4HI fnu4HI  
 thaI hinPI  
 fnuDII/mvnI hhaI/cfoI hinPI  
 bctUI thaI hhaI/cfoI  
 hinPI aciI fnuDII/mvnI rmaI  
 hhaI/cfoI bstUI hinPI haeII  
 tru9I aciI bsh1236I aciI hhaI/cfoI bsrBI  
 mseI bsh1236I maeIII bbvI maeIII haeII maeI aciI  
 2231 ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT  
 TAATTCGCGC CGCCACACC ACCAATGCGC GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGGGA TCGCGGGCGA  
 mspI nlaIV  
 hpaII hgiJII  
 naeI bsp1286  
 mboII maeII cfr10I aluI bmyI  
 2301 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC  
 GGAAAGCGAA AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CGAAAGGGGC AGTTCGAGAT TTAGCCCCCG  
 Фиг. 32P  
 mnlI  
 nlaIV  
 hgiCI  
 nlaIV banI taqI hphI  
 2371 TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAGGCTT CTGATTGG  
 AGGGAAATCC CAAGGCTAAA TCACGAAATG CCGTGGAGCT GGGGTTTTTT GAACTAAACC  
 maeII haeIII/palI  
 draIII sau96I maeII pleI  
 bsaAI asuI drdI hinfI maeII  
 2401 GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT  
 CACTACCAAG TGCATCACC GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA  
 tru9I pleI bslI  
 mseI hinfI bsrI bslI avaI  
 2501 CTTTAATAGT GGA CTCTTGT TCCAACTGG AACAACACTC AACCTATCT CGGGCTATTC TTTTGATTTA  
 GAAATTATCA CCTGAGAACA AGGTTTGACC TTGTTGTGAG TTGGGATAGA GCCCGATAAG AAACTAAAT  
 tru9I  
 haeIII/palI mseI aluI mseI apoI  
 2571 TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTAAGGATTT AGCTGATTTA ACAAATTTT  
 ATTCCCTAAA ACGGCTAAAG CCGGATAACC AATTTTTTAC TCGACTAAAT TGTTTTTAAA

Фиг. 32Q

thai  
 fnuDII/mvnI  
 apoI  
 bstUI tru9I  
 bsh1236I mseI sspI mseI  
 2631 AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC  
 TTGCGCTTAA AATTGTTTAA TAATTGCAAA TGTTAAAATA CCACGTGAGA GTCATGTTAG  
 hgiAI/aspHI  
 bsp1286  
 bsiHKAI  
 bmyI ddeI  
 apaLI/snoI rsal  
 alw44I/snoI csp6I  
 bsrI hinPI  
 maeIII fnu4HI  
 fnu4HI tru9I maeII nlaIII hhaI/cfoI  
 sfaNI aciI mseI aciI bsaAI tth111I/aspI bbvI  
 2691 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAACTC CGCTATCGCT ACGTGACTGG GTCATGGCTG CGCCCCGACA  
 ACGAGACTAC -GGCGTATCAA TTCGGTTGAG GCGATAGCGA TGCACGTGACC CAGTACCAGC GCGGGGCTGT  
 hinPI sfaNI  
 hhaI/cfoI mspI  
 thaI hpaII  
 fnuDII/mvnI scrFI  
 bstUI nciI  
 nspBII bsh1236I dsaV fokI maeIII  
 aciI aciI hgaI drdI cauII aciI aluI  
 2761 CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGCTCTG CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG  
 GGGCGGTTGT GGGCGACTGC GCGGGACTGC CCGAACAGAC GAGGGCCGTA GGCGAATGTC TGTTCGACAC

### Фиг. 32R

scrFI  
 nciI  
 mspI  
 hpaII nspI  
 dsaV nspHI  
 esp3I fnu4HI  
 bsmAI bbvI  
 bslI cauII aluI nlaIII mnII hphI hphI  
 2831 ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTGAGAGG TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGTATTCTT  
 TGGCAGAGGC CCTCGACGTA CACAGTCTCC AAAAGTGGCA GTAGTGGCTT TGCGCGCTCC GTCATAAGAA  
 mnII  
 haeIII/palI  
 mboII sau96I nlaIII  
 bpuAI asuI tru9I rcaI  
 bbsI ecoO109I/draII mseI bspHI  
 2901 GAAGACGAAA GGGCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG  
 CTTCTGCTTT CCCGGAGCAC TATGCGGATA AAAATATCCA ATTACAGTAC

aciI  
 thaI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I  
 hinPI  
 hhaI/cfoI  
 thaI mnII  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I  
 hinPI  
 hhaI/cfoI  
 2951 ATAATAATGG TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG  
 TATTATTACC AAAGAATCTG CAGTCCACCG TGAAAAGCCC CTTTACACGC  
 hinII/acyI  
 ahaII/bsaHI  
 aatII  
 ddeI maeII

### Фиг. 32S

bsmAI  
rcaI  
bsrBI nlaIII  
aciI bspHI  
nlaIV  
3001 CGGAACCCCT ATTTGTTTAT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCTGA  
GCCTTGGGGA TAAACAAATA AAAAGATTTA TGTAAGTTA TACATAGGCG AGTACTCTGT TATTGGGACT

mboII  
earI/ksp632I  
sspI  
3071 TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTCGCC CTTATTCCT  
ATTTACGAAG TTATTATAAC TTTTTCCTTC TCATACTCAT AAGTTGTAA GGCACAGCGG GAATAAGGGA

fnu4HI  
aciI  
3141 TTTTTCGCGC ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAG  
AAAAACGCCG TAAAACGGAA GGACAAAAAC GAGTGGCTCT TTGCGACCAC TTTCATTTTC

hgiAI/aspHI  
bsp1286  
sau3AI  
bsiHKAI  
mboI/ndeII[dam-]  
dpnI[dam+] bmyI  
dnpII[dam-]  
mboII[dam-] apaLI/snoI  
eco57I alw44I/snoI  
3201 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA  
TACGACTTCT AGTCAACCCA CGTGCTCACC CAATGTAGCT TGACCTAGAG TTGTCGCCAT

Фиг. 32Т

sau3AI  
mboI/ndeII[dam-]  
dnpI[dam+]  
dnpII[dam-]  
alwI[dam-]  
bstYI/xhoII  
3261 AGATCCTTGA GAGTTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTAAAGTTC  
TCTAGGAAGT CTCAAAAGCG GGGCTTCTTG CAAAAGGTTA CTACTCGTGA AAATTTCAAG

scrFI  
nciI  
mspI  
hpaII  
dsaV  
hinII/acyI  
hgaI cauII  
ahaII/bsaHI  
bcgI mcrI fnu4HI  
aciI  
3321 TGCTATGTGG CGCGGTATTG TCCCGTGATG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA  
ACGATACACC GCGCCATAAT AGGGCACTAC TGCGGCCCCG TCTCGTTGAG CCAGCGGCGT

rsaI  
csp6I bsrI  
scaI hphI maeIII  
sfaNI foki  
ddeI  
3381 TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG  
ATGTGATAAG AGTCTTACTG AACCAACTCA TGAGTGGTCA GTGTCTTTTC GTAGAATGCC

Фиг. 32У

haeIII/palI  
 eaeI  
 cfrI  
 fnu4HI  
 fnu4HI  
 nlaIII  
 bbvI  
 nlaIII  
 aciI  
 3441 ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG CCAACTTACT  
 TACCGTACTG TCATTCTCTT AATACGTCAC GACGGTATTG GTACTCACTA TTGTGACGCC GGTGAATGA  
 sau96I  
 avaII  
 sau3AI asuI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+]  
 dpnII[dam-]  
 pvuI/bspCI  
 mcrI mnlI  
 aluI aciI  
 nlaIII alwI[dam-]  
 3511 TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACCTCGC  
 AGACTGTTGC TAGCCTCCTG GCTTCCTCGA TTGGCGAAAA AACGTGTTGT ACCCCCTAGT ACATTGAGCG  
 mspI  
 sau3AI nlaIV  
 mboI/ndeII[dam-] aluI  
 dpnI[dam+] hpaII  
 dpnII[dam-] bsaWI  
 maeIII sfaNI fnu4HI  
 3581 CTTGATCGTT GGAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCAGCAG  
 GAAGTAGCAA CCCTTGGCCT CGACTTACTT CGGTATGGTT TGCTGCTCGC ACTGTGGTGC TACGGTCGTC

# Фиг. 32V

hinPI  
 hhaI/cfoI  
 mstI  
 aviII/fspI  
 bsrI  
 maeII  
 pspl406I  
 maeI  
 mspI  
 hpaII  
 scrFI  
 aluI  
 nciI  
 rmaI  
 dsaV  
 cauII  
 3651 CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAAGTATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC  
 GTTACCGTTG TTGCAACGCG TTTGATAATT GACCGCTTGA TGAATGAGAT CGAAGGGCCG  
 bglI  
 sau96I  
 haeIII/palI  
 sau96I  
 hinPI  
 mspI  
 hpaII  
 hhaI/cfoI  
 3711 AACAAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCCC TTCCGGCTGG  
 TTGTTAATTA TCTGACCTAC CTCCGCCTAT TTCAACGTCC TGGTGAAGAC GCGAGCCGGG AAGGCCGACC  
 mspI  
 hpaII  
 cfr10I  
 nlaIV hphI  
 gsuI/bpmI  
 bsmAI  
 bsaI  
 bsh1236I  
 fnu4HI  
 3781 CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC  
 GACCAAATAA CGACTATTTA GACCTCGGCC ACTCGCACCC AGAGCGCCAT AGTAACGTGC

# Фиг. 32W

sau96I  
 asuI  
 nlaIV  
 bsrI haeIII/palI mnlI eam1105I  
 3841 ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC  
 TGACCCCGGT CTACCATTCT GGAGGGCATA GCATCAATAG ATGTGCTGCC CCTCAGTCCG

ddeI  
 sau3AI nlaIV  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+] hgiCI tru9I  
 dpnII[dam-] banI mnlI mseI  
 3901 AACTATGGAT GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG  
 TTGATACCTA CTTGCTTTAT CTGTCTAGCG ACTCTATCCA CGGAGTGACT AATTCGTAAC

tru9I  
 mseI tru9I  
 maeIII ahaIII/draI mseI  
 3961 GTAAGTGTCA GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAC TTCATTTTAA  
 CATTGACAGT CTGGTTCAAA TGAGTATATA TGAAATCTAA CTAAATTTTG AAGTAAAAAT

rmaI sau3AI  
 sau3AI hphI mboI/ndeII[dam-]  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+] dpnI[dam+]  
 dpnII[dam-] dpnII[dam-]  
 tru9I bstYI/xhoII alwI[dam-] nlaIII maeII  
 mseI alwI[dam-] bstYI/xhoII rcaI tru9I  
 ahaIII/draI maeI mboII[dam-] bspHI mseI  
 4021 ATTTAAAAGG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG  
 TAAATTTTCC TAGATCCACT TCTAGGAAAA ACTATTAGAG TACTGGTTTT AGGGAATTGC ACTCAAAGC

sau3AI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+] sau3AI  
 dpnII[dam-] mboI/ndeII[dam-]  
 bstYI/xhoII dpnI[dam+]  
 sau3AI alwI[dam-] dpnII[dam-]  
 mboI/ndeII[dam-] alwI[dam-]  
 dpnI[dam+] mboII[dam-]  
 dpnII[dam-] bstYI/xhoII  
 4091 TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT  
 AAGGTGACTC GCAGTCTGGG GCATCTTTTC TAGTTTCCTA GAAGAACTCT AGGAAAAAAA

thaI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I  
 hinPI fnu4HI aciI  
 hhaI/cfoI bbvI nspBII  
 4151 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTGTTTG  
 GACGCGCATT AGACGACGAA CGTTTGTTTT TTTGGTGGCG ATGGTCGCCA CCAAACAAAC

sau3AI  
 mboI/ndeII[dam-]  
 dpnI[dam+]  
 dpnII[dam-]  
 alwI[dam-]  
 mspI bsrI hinPI  
 hpaII aluI maeIII eco57I hhaI/cfoI  
 4211 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAGTG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG  
 GGCTAGTTC TCGATGGTTG AGAAAAAGGC TTCCATTGAC CGAAGTCGTC TCGCTCTAT GGTATTATGAC

Фиг.32X

Фиг.32Y

rmaI haeIII/palI  
 maeI bslI haeI scfI aciI mnlI  
 4281 TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT  
 AGGAAGATCA CATCGGCATC AATCCGGTGG TGAAGTTCTT GAGACATCGT GGCGGATGTA TGGAGCGAGA  
 scrFI  
 nciI  
 mspI  
 hpaII  
 dsaV pleI  
 cauII hinfI  
 4351 GCTAATCCTG TTACCACTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA  
 CGATTAGGAC AATGGTCACC GACGACGGTC ACCGCTATTC AGCACAGAAT GGCCCAACCT GAGTTCTGCT  
 hgiAI/aspHI  
 bspI286  
 bsiHKA1  
 bmyI  
 apaLI/snoI  
 alw44I/snoI aluI  
 4421 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCAGC TTGGAGCGAA  
 ATCAATGGCC TATTCCGCGT CGCCAGCCCG ACTTGCCCCC CAAGCACGTG TGTCGGGTGCG AACCTCGCTT  
 hinPI  
 hhaI/cfoI  
 haeII  
 4491 CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA  
 GCTGGATGTG GCTTGACTCT ATGGATGTG CACTCGTAAC TCTTTCGCGG TGCGAAGGGC TTCCCTCTTT

# Фиг.322-1

scrFI  
 mvaI  
 ecoRII mvaI  
 dsaV ecoRII  
 bstNI  
 bsaJI  
 hinPI mnlI  
 hhaI/cfoI aluI apyI[dcn+]  
 4561 GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAC  
 CCGCCTGTCC ATAGGCCATT CGCCGTCCCA GCCTTGTCTT CTCGCGTGCT CCCTCGAAGG TCCCCCTTTG

scrFI

dsaV  
 bstNI  
 apyI[dcn+]  
 4631 GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTGT TGATGCTCGT  
 CCGACCATAG AAATATCAGG ACAGCCCAAA GCGGTGGAGA CTGAACTCGC AGCTAAAAAC ACTACGAGCA

haeIII/palI  
 fnu4HI  
 aciI  
 thaI bslI  
 fnuDII/mvnI  
 bstUI  
 bsh1236I  
 nlaIV  
 aciI  
 4701 CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAACGCCA GCAACGCGGC  
 GTCCCCCGC CTCGGATACC TTTTTCGGGT CGTTGCGCCG

# Фиг.322-2

```

          haeIII/palI
scrFI
mvaI bslI
ecoRII
dsaV          nlaIII
bstNI          nspI
          apyI[dcM+] haeIII/palI nspHI          tfil
          nlaIV haeI haeI aflIII          hinfI
4741 CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT
      GAAAAATGCC AAGGACCGGA AAACGACCGG AAAACGAGTG TACAAGAAAG GACGCAATAG GGGACTAAGA

          fnu4HI
          bbvI
          bsrBI aciI
          aciI aluI aciI fnu4HI mcrI
4811 GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCGCAG CCGAACGACC
      CACCTATTGG CATAATGGCG GAAACTCACT CGACTATGGC GAGCGGCGTC GGCTTGCTGG

          hinPI
          haeII
          fnu4HI          sapI hhaI/cfoI
          bbvI pleI          mboII          mnlI
          hinPI hinfI          hhaI/cfoI          mnlI aciI earI/ksp632I          aciI
4871 GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC
      CTCGCGTCGC TCAGTCACTC GCTCCTTCGC CTTCTCGCGG GTTATGCGTT TGGCGGAGAG

```

### Фиг. 322-3

```

          thaI
          fnuDII/mvnI
          bstUI
          bsh1236I
          hinPI
          hhaI/cfoI
          thaI
          fnuDII/mvnI
          bstUI          tru9I aluI
          bsh1236I haeIII/palI          pvuII
          bslI eaeI tfil aseI/asnI/vspI
          aciI cfrI hinfI msel nspBII          bsrI          aciI
4931 CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATCCAGC TGGCAGCACA GGTTTCCCGA CTGGAAAGCG
      GGGCGCGCAA CCGGCTAAGT AATTAGGTCG ACCGTGCTGT CCAAAGGGCT GACCTTTCGC

          scrFI
          mvaI
          ecoRII
          dsaV
          nlaIV bstNI
          hinPI          msel          maeIII          hgiCI apyI[dcM+]
          hhaI/cfoI aseI/asnI/vspI mnlI          banI bsaJI
4991 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TACCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA CACTTTATGC
      CCGTCACTCG CGTTGCGTTA ATTACTCA ATGGAGTGAG TAATCCGTGG GGTCCGAAAT GTGAAATACG

```

### Фиг. 322-4

```

          mspI          aciI
          hpaII          bsrBI          aluI          nlaIII
5061 TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACA GGAAACAGCT ATGACCATGA
      AAGGCCGAGC ATACAACACA CCTTAACACT CGCCTATTGT TAAAGTGTGT CCTTTGTCGA TACTGGTACT

```

```

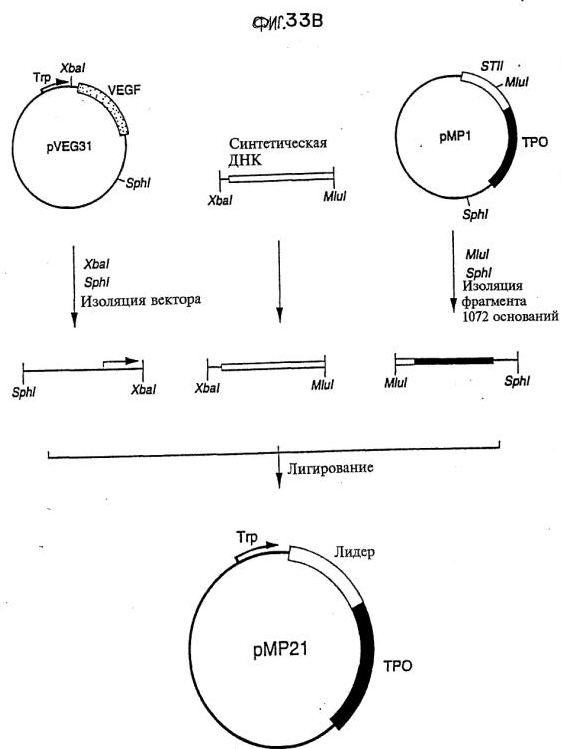
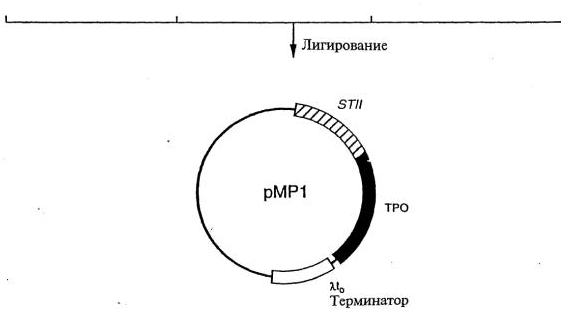
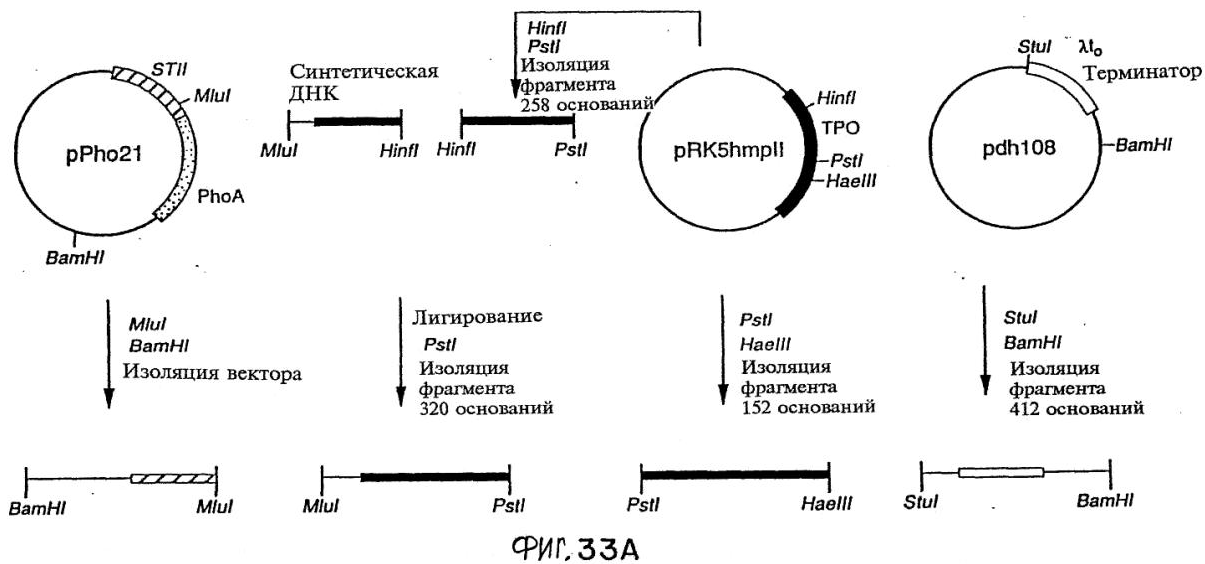
          tru9I
          msel
          aseI/asnI/vspI
          xmnI
          asp700
5131 TTACGAATTA A
      AATGCTTAAT T

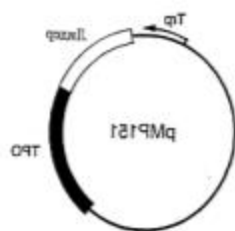
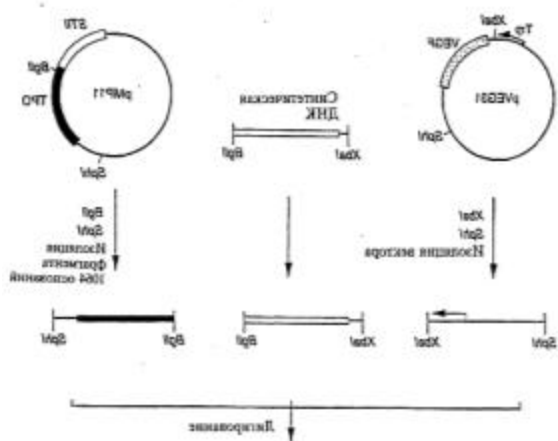
```

### Фиг. 322-5

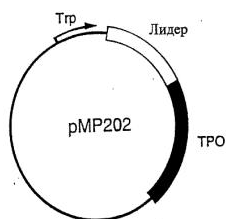
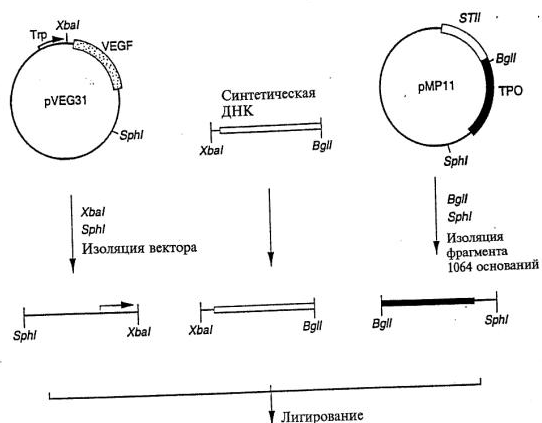
>length: 5141



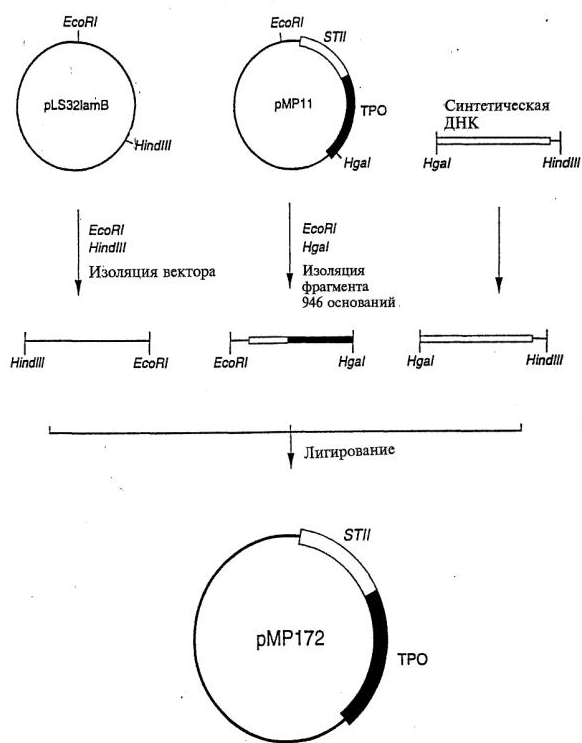




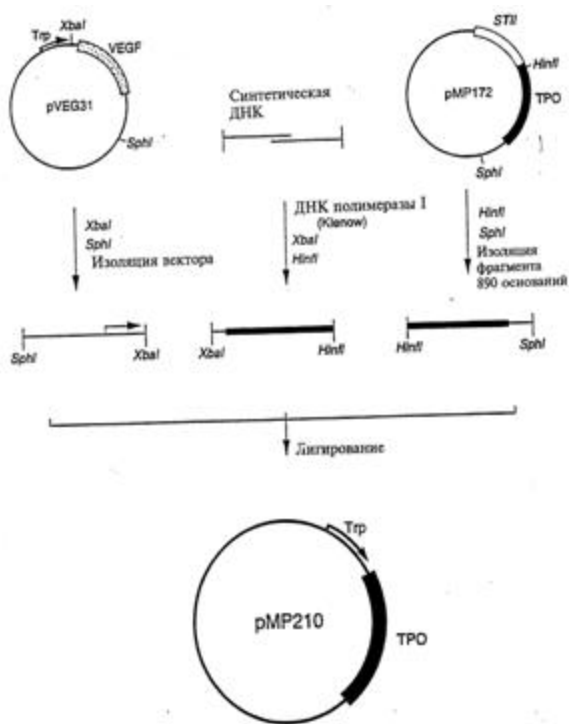
Фиг. 35



Фиг. 36



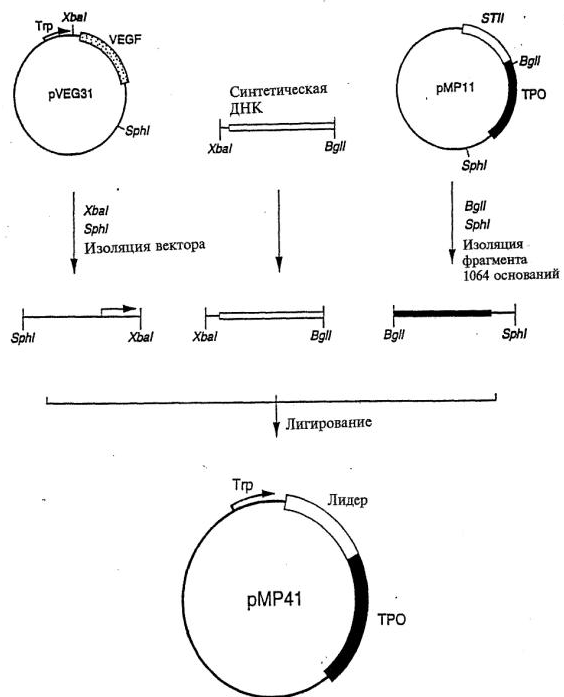
Фиг. 37



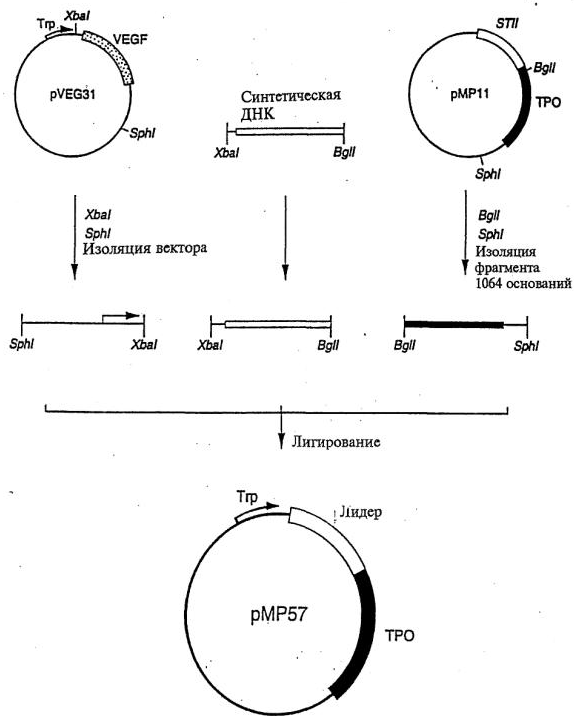
Фиг. 38

	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala
MP210 Bank	ATG	TCN	CCN	GCN	CCN	CCN	GCN
MP210-1	ATG	TCT	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG
MP210-T8	ATG	TCG	CCT	GCT	CCA	CCT	GCT
MP210-21	ATG	TCG	CCA	GCG	CCA	CCA	GCC
MP210-24	ATG	TCC	CCA	GCC	CCA	CCC	GCA
MP210-25	ATG	TCG	CCA	GCG	CCG	CCA	GCG

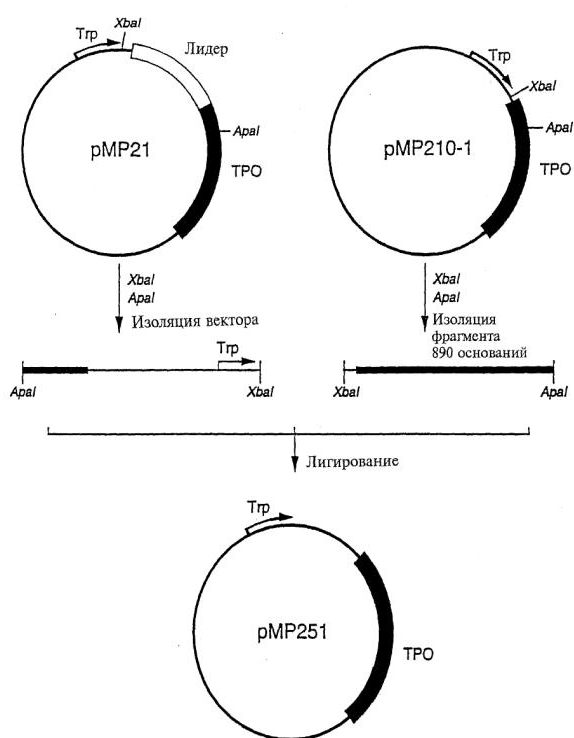
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42