

(19)



(10) **LT 3944 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3944**

(51) Int. Cl.⁵: **C12P 21/00**

(21) Paraiškos numeris: **IP1481**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 11 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **PCT/US 85/02405, 1985 12 03**
SU 4203324, 1987 09 09

(31, 32, 33) Prioritetas: **677813, 1984 12 04, US**
688622, 1985 01 03, US
693258, 1985 01 22, US

(72) Išradėjas:
Edward Fritsch, US
Rodney M. Hewick, US
Kenneth Jacobs, US

(73) Patento savininkas:
GENETICS INSTITUTE, INC., 87, Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts 02140-2387, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:
39988, 39989, 39990, 39991, 40150, 40151, 40152, 40153, 40154, 40155,
40156, CRL 8695, American Type Culture Collection, US

(54) Pavadinimas:
Eritropoetino gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradime aprašomi žmogaus eritropoetino (EPO) klonuoti genai, kurie leidžia gauti labai didelę ekspresiją. Taip pat aprašyta šių genų ekspresija *in vitro*, gaminant aktyvų žmogaus EPO.

Šiame išradime aprašomi klonuoti žmogaus eritropoetino genai, kurių ekspresijos lygis nepaprastai aukštas, minėtų genų ekspresija ir aktyvus žmogaus eritropoetino in vitro gavimas.

5

Eritropoetinas (toliau - EPO) - tai organizme cirkuliuojantis glikoproteinas, kuris stimuliuoja eritrocitų susidarymą aukštesniuose organizmuose (žr. Carnot et al, Compt. Rend., 143:384 (1906)). Todėl EPO kartais vadinamas
10 eritropoezę stimuliuojančiu faktoriumi.

Žmogaus eritrocitų gyvavimo trukmė yra maždaug 120 dienų. Tai reiškia, kad retikulo-endotelio sistema kasdien suardo maždaug 1/120 visų eritrocitų ir lygia greta kasdien
15 santykinai pastovų kiekį pagamina, siekdama nuolat palaikyti eritrocitų balansą (Guyton, Textbook of Medical Physiology, pp 56-60, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1976)).

Eritrocitai gaminami kaulų čiulpuose bręstant ir
20 diferencijuojantis eritroblastams, o EPO yra faktorius, kuris veikia mažiau diferencijuotas ląsteles ir indukuoja jų diferenciaciją į eritrocitus (Guyton, supra).

EPO yra perspektyvus terapinis agentas klinikiniam anemijos, ypač inkstų anemijos gydymui. Deja, praktinėje terapijoje EPO plačiai dar netaikomas, nes yra sunkiai prieinamas.

- 5 Norint EPO naudoti kaip terapinį agentą, reikia įvertinti galimas problemas, susijusias su antigeniškumu. Todėl geriau EPO gaminti iš žmogaus tiekiamų žaliavų. Pavyzdžiui, galima panaudoti donorų kraują arba sergančių aplastine anemija ir panašiomis ligomis (tuomet išsiskiria didelis EPO kiekis)
- 10 šlapimą. Deja, šių žaliavų kiekis yra ribotas. Žr., pavyzdžiui, White et al., Rec. Progr. Horm. Res., 16:219 (1960); Espada et al., Biochem. Med. 3:475 (1970); Fisher, Pharmacol.Rev., 24:459 (1972) ir Gordon, Vitam. Horm. (N. Y.), 31:105 (1973), kurių aprašymai įtraukiami į šį
- 15 išradimą.

- Paprastai EPO gaminamas koncentruojant ir gryninant pacientų šlapimą, kuriame yra didelė EPO koncentracija, pavyzdžiui, pacientų, sergančių aplastine anemija ir kitomis panašiomis
- 20 ligomis. Žr., pavyzdžiui, JAV patentus Nr. 4,397,840; 4,303,650 ir 3,865,801, kurie yra šio išradimo dalis. Riboti tokio šlapimo ištekliai trukdo naudoti EPO praktikoje, todėl būtų pageidautina EPO gaminti iš sveikų individų šlapimo. Sveikų žmonių šlapimo panaudojimas yra problemiškas, nes
- 25 jame yra žymiai mažiau EPO, negu anemija sergančių individų šlapime. Be to, sveikų individų šlapime yra kai kurių inhibuojančių faktorių, kurie, esant pakankamai aukštai koncentracijai, slopina eritropoezę, todėl patenkinamas terapinis efektas gali būti gautas tik vartojant labai gerai
- 30 išgrynintą EPO.

- EPO taip pat galima gaminti iš avių kraujo plazmos. Iš tokio kraujo plazmos išskirto EPO buvo pagaminti patenkinamo aktyvumo, stabilūs ir tirpūs vandenyje preparatai. Žr.
- 35 Goldwasser, Control Cellular Dif. Develop., Part A; pp. 487-494, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1981) (šis straipsnis įtraukiamas į šio išradimo aprašymą). Tačiau, galima teigti,

kad avies EPO turėtų pasižymėti antigeniškumu žmogaus organizme.

5 Taigi nors EPO yra labai pageidaujamas terapinis agentas, standartinės išskyrimo ir gryninimo metodikos, naudojamos dirbant su natūralios žaliavos šaltiniais, neatitinka šio junginio masinės produkcijos poreikio.

10 Sugimoto et al. JAV patente Nr. 4,377,513 aprašo EPO pramoninės gamybos būdą, kurio sudėtyje yra žmogaus limfoblastoidų ląstelių - jų tarpe Namalwa, BALL-1, NALL-1, TALL-1 ir JBL - multiplikavimas in vivo.

15 Komercinėje literatūroje pranešama apie EPO, pagamintą genų inžineriniais būdais, tačiau nėra paskelbta nei šių būdų aprašymai, nei produkto cheminė sudėtis. Ši paraiška atskleidžia baltymų, pasižyminčių biologinėmis žmogaus EPO savybėmis, pramoninio gaminimo būdą. Šiuo būdu taip pat 20 įmanoma gaminti baltymus, kurių cheminė sudėtis skiriasi nuo autentiško EPO, tačiau pasižymi panašiomis (o kai kuriais atvejais ir pagerintomis) savybėmis. Patogumo dėlei visus baltymus, pasižyminčius žmogaus EPO biologinėmis savybėmis galima vadinti EPO, nesvarbu, ar šie junginiai yra chemiškai identiški EPO.

25 Šiame išradime aprašomas geno, kuris ekspresuoja nepaprastai didelius žmogaus EPO kiekius, klonavimas, EPO ekspresija ir aktyvaus žmogaus EPO pramoninė gamyba in vitro. Taip pat aprašyti ekspresijos vektoriai, tinkami EPO gaminimui, 30 ekspresijos ląstelės, gryninimo schemas ir kiti procesai. EPO buvo gautas nepilnai išgrynintas, po to išgrynintas iki homogeniškumo ir tripsinu suskaldytas į specifinius fragmentus (šių operacijų detalės pateiktos toliau). Šie fragmentai buvo išgryninti ir sekvenuoti. Remiantis šiomis 35 sekomis buvo sukonstruoti ir susintetinti EPO oligonukleotidai. Šie oligai buvo panaudoti žmogaus genomo bibliotekos skryningui, siekiant išskirti EPO geną.

EPO genas buvo patikrintas, remiantis jo DNR seka, kuri atitiko daugumą sekvenuotų triptinių fragmentų. Genominio klonų dalis buvo panaudota hibridizacijos testu siekiant pademonstruoti, kad EPO mRNR galima aptikti žmogaus gemalo (20 savaičių) mRNR. Buvo paruošta žmogaus gemalo kepenų kDNR biblioteka ir atliktas jos skryningas. Buvo gauti trys EPO kDNR klonai (patikrinus daugiau kaip 750 000 rekombinantų). Nustatyta, kad du iš šių klonų yra maksimalaus ilgio, sprendžiant pagal visą koduojančią seką ir pagrindinę 5' ir 3' netransliuojamą seką. Šios kDNR buvo ekspresuotos ir beždžionių ląstelėse, transformuotose SV-40 virusu (COS-1 ląstelių linija; Gluzman, Cell 23:175-182 (1981)), ir kuniškojo žiurkėno kiaušidžių ląstelėse (CHO ląstelių linija; Urlaub, G. ir Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4280 (1980)). EPO, pagamintas COS ląstelėse, yra biologiškai aktyvus tiek in vitro, tiek in vivo. EPO, pagamintas CHO ląstelėse, taip pat aktyvus tiek in vitro, tiek in vivo.

EPO kDNR klonas turi įdomų atvirą skaitymo rėmelį, sudarytą iš 14-15 amino rūgščių (ar), su iniciatoriumi ir terminatoriumi iš 20-30 nukleotidų (nt), esančių virš koduojančio regiono. Charakteringas E. coli, transfekuotos klonuotu EPO genu, pavyzdys deponuotas Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, No. ATCC 40153).

Lentelėje 1 pateikta žmogaus EPO geno 87 bazių porų egzono bazinė seka;

Fig.1 iliustruoja EPO mRNR nustatymą žmogaus gemalo kepenų mRNR;

Lentelėje 2 pateikta EPO baltymo amino rūgščių seka, nustatyta pagal λ -HEPOFL13. nukleotidų seką;

Lentelėje 3 pateikta EPO kDNR nukleotidų seka λ -HEPOFL13 (schematiškai pateikta Fig.2) ir pagal šią seką nustatyta amino rūgščių seka;

Fig. 3 parodytos keturių nepriklausomų žmogaus EPO genomo klonų DNR intarpų santykinės padėtys;

Fig. 4 parodytas žmogaus EPO geno intronų ir ekzonų spėjama struktūra;

- 5 Lentelėje 4 parodyta EPO geno, pateikto Fig. 4B, DNR seka;
Fig. 5A, 5B ir 5C parodyta vektoriaus 91023 (B) struktūra;
Fig. 6 pateikta EPO, pagaminto COS-1 ląstelėse ir natyvaus EPO palyginamoji analizė NDS poliakrilamido gelyje;
Lentelėje 5 pateikta EPO klonų λ-HEPOFL6 nukleotidų ir amino rūgščių seka;
10 Lentelėje 6 pateikta EPO klonų λ-HEPOFL8 nukleotidų ir amino rūgščių seka;
Lentelėje 7 pateikta EPO klonų λ-HEPOFL136 nukleotidų ir amino rūgščių seka;
15 Fig. 7 pateikta plazmidės pRK1-4 schema;
Fig. 8 pateikta plazmidės pdBPV-MMTneo(342-12) schema.

Šiame išradime aprašomas EPO genų klonavimas ir EPO gaminimas ekspresuojant šiuos genus in vitro.

20

- Patentinėje ir mokslinėje literatūroje aprašyta daugybė rekombinantinių produktų gaminimo būdų. Dažniausiai šios metodikos apima reikiamos genų sekos išskyrimą arba sintezę bei šios sekos ekspresavimą prokariotinėje arba
25 eukariotinėje ląstelėje, naudojant specialistams žinomus metodus. Jeigu genas išskirtas, išgrynintas ir įterptas į perkėlimo vektorių (klonuotas), tuomet pakankamas jo kiekis užtikrintas. Vektorius su klonuotu genu perkeliamas į tinkamą mikroorganizmą arba ląstelių liniją, sakykim,
30 bakteriją, mieles, žinduolių ląsteles, pavyzdžiui, COS-1 (beždžionės inkstų), CHO (kuniškojo žiurkėno kiaušidžių), vabzdžių ląstelių linijas ir panašiai. Vektorius replikuoja tuomet, kai mikroorganizmas arba ląstelių linija proliferuoja ir jis gali būti išskirtas, naudojant
35 standartinius metodus. Taigi taip atsiranda nuolat atsinaujinantis geno šaltinis tolesnėms manipuliacijoms,

modifikacijoms ir perkėlimams į kitus vektorius ar į kitus to paties vektoriaus lokusus.

Dažnai ekspresija gaunama perkeliant tinkamai orientuotą ir
5 tinkamame rėmelyje esantį klonuotą geną į atitinkamą
perkėlimo vektoriaus saitą taip, kad transliacinis
perskaitymas iš prokariotinio arba eukariotinio geno
susintetina baltymo pirmtaką, apimantį amino rūgščių seką,
kuria koduoja klonuotas genas, kartu su Met arba N-galo seka
10 iš prokariotinio arba eukariotinio geno. Kitais atvejais
transkripcijos ir transliacijos pradžios signalus gali
pateikti tinkami klonuoto geno fragmentai. Susintetintas
baltymo pirmtakas gali būti skaldomas naudojant įvairius
specifinio baltymų skaldymo pageidaujamoje vietoje būdus -
15 taip gaunama pageidaujama amino rūgščių seką, kuri vėliau
išgryninama standartiniais metodais. Kartais baltymą,
turintį pageidaujamą amino rūgščių seką, pavyksta pagaminti
nenaudojant specifinio skaldymo metodų, arba išskirti jį iš
ekstraląstelinę augimo terpę.

20

Žmogaus EPO genomino klonų išskyrimas

Žmogaus EPO buvo išgrynintas (kaip tai aprašyta žemiau) iki
homogeniško baltymo iš pacientų, sergančių aplastine
25 anemija, šlapimo. Išgrynintas EPO buvo visiškai suskaldytas
tripsinu, gauti fragmentai atskirti HPLC atvirkštinės fazės
būdu, išskirti iš surinktų gradientinių frakcijų bei
nustatyta jų seka. Triptinių fragmentų sekos pabrauktos
Lentelėse 2 ir 3 ir toliau aptartos detaliau. Dvi amino
30 rūgščių sekos, Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys ir Val-Tyr-Ser-
Asn-Phe-Leu-Arg buvo atrinktos oligonukleotidinių zondu
sukūrimui (vienoje grupėje - 17 nt ilgio oligonukleotidai,
išsigimę 32 kartus, kitoje - 18 nt ilgio oligonukleotidai,
išsigimę 128 kartus, priklausantys pirmajam triptiniam
35 fragmentui bei dvi grupės, kuriose yra 14 nt
oligonukleotidai, išsigimę kiekvienas 128 kartus,
priklausantys antrajam peptidiniam fragmentui). Grupė,

kurioje yra 17-merai, išsigimę 32 kartus, buvo naudojama žmogaus genomo DNR bibliotekos skryningui Ch4A vektoriuje (22) pagal Woo or O'Malley amplifikacijos in situ procedūros modifikaciją (Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 75:3688, 1978), siekiant pagaminti skryningo filtrus.

Fagai, kurie hibridizuoja su 17-meru, surenkami, padalinami į kelias grupes ir bandomi hibridizuoti su 14-merų ir 18-merų grupėmis. Fagai, kurie hibridizuoja su 17-merų, 18-merų ir 14-merų grupėmis, buvo išgryninti pagal lizės dėmių morfologiją ir fragmentai subklonuoti į M13 vektorius, siekiant sekvenuoti didezoksi grandinės terminavimo būdu (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 74:5463, 1977).

gatactacgcatgtggccaggccagagcccttcagggaaccttgaatccccggggctgtgtgcatttcagg

B

ACG	GGC	TGT	GCT	GAA	CAC	TGC	AGC	TTG	AAT	GAG	AAT	ATC
Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile

ACT	GTC	CCA	GAC	ACC	AAA	CTT	AAT	TTC	TAT	GCC	TGG	AAG
Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys

AGG ATG GAGtgatctctttttttctctcttttggaatcctttggagcctg
Arg MET Glu d ,

atttggatgaaagggaatgac

	-27	MET	GLY	VAL	HIS	GLU	CYS	PRO
ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY VAL LEU CYS GLY								

1 10 20

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys

SH

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
 30 50

	50						60												
Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala

LT 3944 B

Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	70	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	80
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

[illegible][illegible]

Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	140	
										130										

[illegible]

<u>Cys</u>	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg	166
SH						

Lentelė 3

ccccgagcc gacccggccc gctctgctccc gacccggccc

ccctgacag ccgccccctc ctccagggccc gtcggggctgg ccctgcaccc cggagcttcc cgggaggggg cccccgggtgt

-27

ggtcacccgg cggccccccag gtcgctgggg gacccccggcc aggcgcggag
 MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
 ATG CGG CTG CAC GAA TGT CCT

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
 GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTC TCC CTC CTC TCG CTC CCT CTC GCC CTC CCA CTC CTG GCC

1

SH

10

20

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
 GCC CCA CCA CGC CTC CTC ATC ATC TGT GAC GAC AGC CGA GTC CTC CTG GAG GAG TAC CTC TTG GAG GCC AAG

*

SH

30

SH

40

Glu Ala Glu -Asn Ile Thr -Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
 GAG GCC GAG AAT ATC ATC ACC ACC GGC TGT CCT GCT GAA CAC TCC AGC TTG AAT CAG AAT ATC ACT

50

60

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
 CTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GGC TGG TGG AAG AGC ATG GAG CTC CGC CAG CAG GCC

70

80

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Leu Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GGC CTG CTC CTG TCG TCG GAA GCT GTC CTC CGG CGC CAG GCC CTC

*

90

100

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
 TTG CTC AAC TCT TCC CAG CAG CCG TGG TGG GAG CCC CTC CTC CAG CTC CAT CTC GAT AAA CCC GTC AGT

110

120

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
 GCC CTT CCC AGC CTC ACC ACT ACT CTG CTT CCG CCT CTC CCA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TCC

Lentele 3 (tesinys)

130									
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu
CCT	CCA	GAT	GGG	GGC	TCA	CCT	CCT	CCA	CTC
Arg	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe
AAA									
150									
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg
CTC	TTC	CGA	CTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGG
Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
GGC									
166									
SH									
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg				
TGC	AGG	ACA	GGG	GAC	ACA	TCA	ccaggTg	TgtccacTg	ggcatatcca
Arg									
gcctgtgccA			caaccctccc			cgccactcct	gaaccccgTc	gaggggctct	cagctcagcg
ccatggacac			tccagTggca			gcaatggacnt	ctcagggggc	agagggnaCTg	tccagagagc
tctaaggatg			tcacagggcc			aacttggagg	cccagagcag	gaagcatcca	gagugcagct
ggacagagcc			atgttgggaa			gaugcctggag	ctcactcggc	accctggcaaa	atttgatgcc
tTggagggcgA			tttaactgtt			tccgcacctA	ccatcagggA	caggttgacc	tggagaaactt
cTgtgacttc			tccaggtctc			acggggcatgg	gcactccctt	ggTggcaaga	ggccccctTga
gTggggaaCCA			tgaagacaggg			atggggggctg	gcctctggct	ctcatggggct	ccnagttttg
aacctcatTg			acaagaaactg			aaacccaCCA	aaaaaaaaaaaa		

Lentelėje 1 parodyta regiono, kuris hibridizuoja su 32 kartus degeneruotu 17-meru viename iš klonų, seka. Šios DNR sekos atvirame skaitymo rėmelyje yra nukleotidai, kurie gali tiksliai koduoti triptinį fragmentą, kuris buvo naudojamas
 5 17-merų grupės struktūros konstravimui. Be to, DNR sekos analizė parodė, kad regionas, su kuriuo hibridizavo 17-meras, yra 87 bp egzone, kuri supa potencialus splaisingo akceptorius ir donoro saitai.

10 Papildomas patvirtinimas, kad šie du klonai (čia žymimi λ -HEPO1 ir λ -HEPO2) yra EPO genominiai klonai, buvo gautas sekvenuojant papildomus egzonus, kuriuose yra kita triptinius fragmentus koduojanti informacija.

15 EPO kDNR klonų išskyrimas

Žmogaus gemalo (20 savaičių) Northern Blot analizė (Derman, E., et al., Cell 23:731, 1981) buvo atlikta naudojant 95 nt viengrandį mėginį, paruoštą iš M13
 20 klonu, kuriame yra dalis 87 bp egzono, aprašyto Lentelėje 1. Kaip parodyta Fig. 1, gemalo kepenų mRNR gali būti aptiktas stiprus signalas. Šią juostelę pavyko patikimai identifikuoti kaip mRNR EPO naudojant tą patį gemalo kepenų mRNR mėginį bakteriofago λ kDNR bibliotekos skryningui (Toole,
 25 J. J., et al., Nature in Press, 1984).

Kelių hibridizuojančių klonų ir patikrintų rekombinantų santykis buvo 1:250 000. Visa nukleotidų seka ir numatyta amino rūgščių seka šiems klonams (λ -HEPOFL13 ir λ -HEPOFL8) parodyta lentelėse 5 ir 6. EPO koduojanti informacija yra kDNR 5' gale, 594 nt regione, kuriame yra labai hidrofobinis lyderis, sudarytas iš 27 amino rūgščių, ir brandus baltymas, sudarytas iš 166 amino rūgščių.

Brandaus baltymo N galas buvo identifikuotas remiantis N galine seka baltymo, kuris sekretuojamas į individų, sergančių aplastine anemija, šlapimą (lentelė 1), kaip tai aprašė Goldwasser (Blood Suppl. 1, 58, xlii (abstr), 1981), Sue ir Sytkowski (Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 80:3651-3655, 1983) ir Yanagawa (J. Biol. Chem. 259:2707-2710, 1984). Kol kas nežinoma, ar šis N galas (Ala-Pro-Pro-Arg---)

ir yra tikrasis cirkuliuojančio organizme EPO N galas, ar inkstuose arba šlapime įvyksta skilimas.

5 Lentelėse 2 ir 3 pabrauktos amino rūgščių sekos yra tie N galo arba jo dalies triptiniai fragmentai, kurių baltymų seka ir buvo gauta. Numatyta amino rūgščių seka visiškai sutampa su triptiniais fragmentais, kurie buvo sekvenuoti - tuo patvirtinama, kad išskirtas genas koduoja žmogaus EPO.

10 Žmogaus EPO geno struktūra ir seka

Fig. 3 parodytos keturių nepriklausomų žmogaus EPO genominių klonų DNR intarpų santykinės pozicijos. Šių klonuotų DNR hibridizacinė analizė su oligonukleotidų mėginiais ir kitais
15 mėginiais, paruoštais iš EPO kDNR dviejų klasių klonų, leidžia lokalizuoti EPO geną 3.3 kb regione, kuris parodytas Fig. 3 pastorinta linija. Visa šio regiono sekos analizė (žr. Pvz. 4) ir palyginimas su kDNR klonais leidžia sudaryti EPO geno introno ir egzono struktūros žemėlapi, parodytą

20 Fig. 4. EPO genas yra padalintas į penkis egzonus. Dalis egzono I, egzonai II, III, IV bei dalis egzono V turi baltymą koduojančią informaciją. Egzono I ir V liekanos koduoja atitinkamai 5' ir 3' netransliuojamas sekas.

25 Pagreitinta EPO ekspresija COS ląstelėse

Siekiant pademonstruoti kad biologiškai aktyvų EPO galima ekspresuoti ląstelių kultūros sistemoje in vitro, buvo tiriamą COS ląstelių ekspresijos sistema (Hewick, R. M., et al. J.Biol. Chem. 256:7990-7997, 1981)

30 Pagreitinantiems tyrimams buvo naudojamas vektorius p91023 (B), aprašytas Pvz. 5. Šiame vektoriuje yra adenoviruso pagrindinis vėlyvasis promotorius, SV40 poliadenilinio seka, SV40 replika, SV40 sustiprintojas ir adenoviruso VA genas. kDNR intarpas iš λ -HEPOFL13 (žr. Lentelę 6) buvo
35 įterptas į p91023 (B) vektorių, žemiau adenoviruso pagrindinio vėlyvojo promotoriaus. Šis naujasis vektorius žymimas pPTFL13.

Praėjus 24 valandoms po šios konstrukcijos transfekcijos į COS-1 ląstelių M6 kamieną (Horowitz et al, J. Mol. Appl. Genet. 2:147-149 (1983)), ląstelės plaunamos, talpinamos į terpę be serumo ir surenkamos po 48 valandų. EPO sekrecijos į terpę lygis matuojamas kiekybiniu RIA metodu, pritaikytu EPO. Kaip parodyta Lentelėje 8, (Pvz. 6) ekspresuojamas imunologiškai aktyvus EPO. Taip pat buvo ištirtas EPO, gaminamo iš COS-1 ląstelių, biologinis aktyvumas. Buvo atliktas atskiras eksperimentas, kurio metu vektorius, EPO kDNR iš λ -HEPOFL13 buvo transfekuotas į COS-1 ląsteles ir terpė surinkta kaip tai apršyta aukščiau. EPO kiekis terpėje buvo nustatytas vienu iš dviejų in vitro biotestų: ^3H -trimidino ir CFU-E (Krystal, G. Exp. Hematol. 11:649-660, 1983; Bersch, N. and Golde, D. W., In vitro Aspects of Erythropoiesis, M. J. Murphy (Ed.) New York: Springer-Verlag, 1978), bei vienu iš dviejų in vivo testų; su hipoksinėmis pelėmis ir badavusiomis žiurkėmis (Cotes, P. M. and Bangham, D. R. Nature 191:1065, 1961; Goldwasser, E. and Gross, M. Methods in Enzymol. 37:109-121, 1975) (žr. Lentelę 9, Pvz. 7). Šie rezultatai demonstruoja, kad COS-1 ląstelės gamina biologiškai aktyvų EPO. Western bloto duomenimis, analizės su poliklonaliniiais anti-EPO antikūniais duomenimis, EPO, pagamintas COS-1 ląstelėse, NDS- poliakrilamidiniame gelyje pasižymi tokio pačiu judrumu, kaip ir natyvus EPO, pagamintas iš šlapimo (Pvz. 8). Todėl galima padaryti išvadą, kad COS-1 pagamintas EPO gali būti panašiai glikozilintas kaip ir natyvus EPO.

Kiti vektoriai, turintys įvairius promotorius, taip pat gali būti panaudoti COS ląstelėse arba kitose žinduolių arba eukariotų ląstelėse. Tokių promotorių pavyzdžiai, naudingi šio išradimo praktikoje, yra SV40 ankstyvasis ir vėlyvasis promotorius, pelės metalotioneino geno promotorius, promotorius, randamas paukščių arba žinduolių retrovirusuose, bakuloviruso poliedrono geno promotoriuje ir kt. Kitų, šio išradimo praktikoje naudingų ląstelių pavyzdžių gali būti E. coli, mielių, žinduolių ląstelės, pavyzdžiui, CHO (kiniškojo žiurkėno kiaušidžių), C127 (beždžionės epitelio), 3T3 (pelės fibroblastų) CV-1 (žaliosios Afrikos beždžionės inkstų) bei vabzdžių ląstelių, pavyzdžiui, iš Spodoptera frugiperda ir Drosophila

metanogaster. Šie alternatyvūs promotoriai ir/arba ląstelių tipai gali turėti įtakos EPO ekspresijos lygiui ir laiko reguliavimui, gaminant ląstelių specifiską EPO tipą, arba auginant didelius EPO gaminančių ląstelių kiekius pigiau ir
5 esant lengviau kontroliuojamoms sąlygoms.

Ekspresijos sistema, kurioje išlieka ekspresijos žinduolių ląstelėse pranašumai, tačiau mažiau laiko sugaištama kuriant labai produktyvią ląstelių liniją, yra sudaryta iš vabzdžių
10 ląstelių linijos ir DNR viruso, kuris dauginasi šioje ląstelių linijoje. Toks virusas vadinamas branduolio poliedrozės virusas. Jis sudarytas iš dvigrandės žiedinės DNR genomo, kurio dydis yra 128 kb. Branduolio kapsida yra pailgos formos ir būna dviejose formose: neokliuduota forma,
15 kai virusas apvilktas membrana ir okliuduota forma, kai virusas yra užkrėstos ląstelės branduolio baltymo kristale. Šiuos virusus galima standartiniu būdu kultivuoti in vitro vabzdžių ląstelių kultūroje ir su jais galima dirbti naudojant visus standartinius gyvūnų virologinius metodus.
20 Ląstelių kultūros terpė yra standartinis maitinantis druskų tirpalas, kuriame yra 10% fetalinio veršelių serumo.

Virusų auginimas in vitro prasideda, kai neokliuduotas virusas (NOV) patenka į ląstelę ir skverbiasi į branduolį,
25 kuriame replikuojasi. Tai - branduolinė replikacija. Pradinėje viruso pridėjimo fazėje (8-18 valandų po užkrėtimo) branduolio kapsidos susigrupuoja branduolyje ir po to pasklinda per plazmos membraną kaip NOV, tuo būdu išplatindamos infekciją visoje ląstelių kultūroje. Be to,
30 kai kurios branduolio kapsidos po to (praėjus 18 ir daugiau valandų po infekcijos) lieka branduolyje ir įstringa baltyminėje medžiagoje - tai yra vadinami poliedriniai įterpimo kūnai (PIB) (polyhedral inclusion bodies). Ši forma neužkrečia ląstelių kultūros. Matrica sudaryta iš baltymo,
35 vadinamo poliedrinu, kurio molekulinė masė yra 33 kd. Kiekvienas PIB yra maždaug 1 mm skersmens, o viename branduolyje gali būti iki 100 PIB. Vėlyvajame infekcijos

etape pagaminama labai daug poliedrino - iki 25%,
skaičiuojant nuo visų ląstelės baltymų.

Kadangi PĪB neturi jokios įtakos in vitro replikacijos
5 ciklui, poliedrino genas gali būti išmestas iš viruso
chromosomos, nepadarant jokios žalos viruso gyvybingumui in
vitro. Naudodami virusą kaip ekspresijos vektorių, mes
pakeitėme poliedrino geno koduojantį regioną svetima DNR,
kuria siekėme ekspresuoti, kontroliuojant poliedrino.
10 promotoriui. Gaunamas viruso fenotipas, nesudarantis PĪB.

Šią sistemą panaudojo keli tyrinėtojai, jų tarpe pažymėtinas
Pennock et al ir Smith et al. Pennock et al. (Gregory D.
Pennock, Charles Shoemaker ir Lois K. Miller, Molecular and
15 Cell Biology 3:84, p. 399-406) aprašė bakterinio baltymo, β -
galaktozidazės aukšto lygio ekspresiją, kai procesas
kontroliuojamas poliedrino promotoriumi.

Kitą ekspresijos vektorių, sukonstruotą iš branduolinės
20 poliedrozės viruso, pasiūlė Smith et al. (Gale E. Smith, Max
D. Summers and M.J. Fraser, Molecular and Cell Biology, May
16, 1983, pp.2156-2165). Autoriai pademonstravo siūlomo
vektoriaus efektyvumą ekspresuodami β -interferoną. Kaip ir
buvo laukta, susintetintas produktas buvo glikozilintas ir
25 sekretuojamas iš vabzdžių ląstelių. Pavyzdyje 14 aprašytos
plazmidės, turinčios Autographa californica branduolinės
poliedrozės viruso (AcNPV) poliedrono geną, modifikacijos,
kurių dėka galima nesunkiai įterpti EPO geną į plazmidę
taip, kad ją transkripciniu būdu kontroliuotų poliedrino
30 promotorius. Gauta DNR transfekuojama kartu su laukinio tipo
AcNPV nepažeista DNR chromosoma į vabzdžių ląsteles. Dėl
genų rekombinacijos AcNPV poliedrino geno regionas
pakeičiamas DNR iš plazmidės. Gautą rekombinantinį virusą
galima aptikti tolesnėse virusų kartose pagal jų DNR esantį
35 EPO geną. Tikimasi, kad užkrėtus šiuo virusu vabzdžių
ląsteles, jos gamins EPO.

Pavyzdžiais 10 ir 11 (CHO), 13 (C127 ir 3T3) ir 14 (vabzdžių ląstelės) iliustruojama EPO ekspresija CHO, C127, 3T3 ląstelėse ir vabzdžių ląstelėse.

- 5 Rekombinantinis EPO, gaminamas CHO ląstelėse, kaip tai parodyta Pavyzdyje 11, buvo išgrynintas, naudojant žinomus chromatografijos kolonose metodus. Santykiniai karbohidratų kiekiai glikoproteine buvo nustatyti dviem nepriklausomais būdais [(i) Reinhold, Methods in Enzymol. 50:244-249
10 (Metanolizė) ir (ii) Takemoto, H. et al., Anal. Biochem. 145:245 (1985) (piridilamininimas, kartu - nepriklausomas sialo rūgšties nustatymas)]. Rezultatai, gauti abiem metodais, labai gerai sutapo. Buvo atliktos kelios analizės, gautos vidutinės reikšmės lyginamos su N-acetilgliukozaminu,
15 kurio kiekis laikomas lygiu 1.

	<u>Karbohidratas</u>	<u>Santykinis molių skaičius</u>
	N-acetilgliukozaminas	1
20	Heksozės:	1.4
	Galaktozė	0.9
	Manozė	0.5
	N-acetilneuramino rūgštis	1
	Fukozė	0.2
25	N-acetilgalaktozaminas	0.1

- Verta pažymėti, kad nemažas kiekis fukozės ir N-acetilgalaktozamino buvo pakartotinai aptinkamas naudojant nepriklausomus karbohidratų analizės metodus. N-acetilgalaktozamino buvimas rodo, kad baltymas yra O-glikozilinio tipo. O-glikozilinimą taip pat patvirtina glikoproteino, suskaldyto įvairiomis glikozidinių fermentų kombinacijomis, SDS-PAGE (elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant natrio dodecilsulfatui) analizė. Kalbant
30 konkrečiau, po to, kai fermentiniu būdu pašalinti visi N-prijungti prie baltymo karbohidratai, naudojant fermentą -

endo F N-glikozidazę, baltymo molekulinis svoris sumažėja SDS-PAGE analizės duomenimis, veikiant jį neuraminidaze.

Išgryninto rekombinantinio EPO biologinis aktyvumas in vitro
5 buvo matuojamas pagal G. Krystal, Exp. Hematol. 11:649
(1983) (blužnies ląstelių proliferacijos testas), o baltymo
kiekis nustatytas analizuojant amino rūgščių sudėtį.
Daugkartinės analizės parodė, kad išgryninto rekombinantinio
EPO apskaičiuotas specifinis aktyvumas in vitro yra didesnis
10 nei 200 000 VV/mg baltymo. Vidutinė reikšmė buvo nuo 275000
iki 300000 VV/mg baltymo. Be to, buvo gaunamos ir reikšmės,
didesnės nei 300000. Aktyvumų santykis in vivo
(policiteminis testas su pelėmis, Kazal ir Erslev, Am.
Clinical Lab. Sci., Vol. B, p. 91 (1975))/in vitro buvo nuo
15 0.7 iki 1.3.

Įdomu palyginti glikoproteino charakteristiką, pateiktą
aukščiau, su rekombinantinio CHO ląstelėse pagaminto EPO
charakteristikomis, kuris aprašytas anksčiau tarptautinėje
20 paraiškoje IPA Publication No. WO85/02610 (publikuota 1985
metų birželio 20). Atitinkama palyginamoji karbohidratų
analizė, aprašyta šios paraiškos 65-ame puslapyje), pateikia
nulines reikšmes fukozei ir N-acetilgalaktozaminui bei
heksozės:N-acetilgalaktozamino santykį, lygų 15.09:1. Tai,
25 kad nėra N-galaktozamino, rodo, kad aprašytasis
glikoproteinas nėra O-glikozilintas. Priešingai, šio
išradimo rekombinantinis EPO, pagamintas CHO ląstelėse ir
apibūdintas aukščiau, turi savo sudėtyje nemažus, daug kartų
matuojant atsikartojančius kiekius fukožės ir N-
30 acetilgalaktozamino bei mažiau nei vieną dešimtadalį
santykinio heksozės kiekio ir yra O-glikozilintas. Be to,
didelis aukščiau aprašyto CHO ląstelėse pagaminto
rekombinantinio EPO specifinis aktyvumas gali būti
tiesiogiai susijęs su charakteringu baltymo glikoziliniu.

35

Biologiškai aktyvus EPO, pagamintas prokariotų arba
eukariotų organizmuose, naudojant šio išradimo klonuotus EPO

genus, gali būti medikų ir veterinarų naudojamas in vivo, gydant žinduolius. Veikliosios medžiagos kiekis, žinoma, priklausys nuo gydomos ligos sunkumo, vartojimo būdo, aktyvaus EPO specifinio aktyvumo, tačiau galutinai tai nuspręs gydantis medikas arba veterinaras. Toks aktyvaus EPO kiekis, kuri nustato gydantis gydytojas, vadinamas „EPO efektyviu terapiniu“ kiekiu. Pavyzdžiui, gydant indukuotą hipoproliferatyvinę avių anemiją, asocijuotą su chronišku inkstų nepakankamumu, efektyvus kasdienis EPO kiekis buvo 10 VV/kg nuo 15 iki 40 dienų. Žr. Eschbach et al., J. Clin. Invest., 74:434 (1984).

Aktyvus EPO gali būti skiriamas bet kuriuo tinkamu gydymui būdu. Labiau tinka leisti EPO į kraują gydomiems žinduoliams. Specialistams suprantama, kad tinkamiausias būdas gali keistis priklausomai nuo gydomos ligos.

Nors galima vartoti EPO kaip gryną arba iš esmės gryną junginį, labiau tinka vartoti EPO kaip farmacinę receptūrą arba preparatą.

Šio išradimo kompozicijos, skirtos tiek medicinai, tiek veterinarijai, turi savo sudėtyje aktyvų EPO baltymą, aprašytą aukščiau, kartu su vienu ar keliais farmaciniu požūriu priimtinais nešėjais ir - kartais - kitais terapiniais ingredientais. Nešėjai turi būti „priimtini“ tuo požūriu, kad jie suderinami su kitais kompozicijos ingredientais ir nekenksmingi pacientui. Pageidautina, kad kompozicijoje nebūtų oksiduojančių agentų ir kitų medžiagų, apie kurias žinoma, kad jos nesuderinamos su peptidais. Kompozicijos gali būti patogiai pateiktos dozės vienetais ir pagamintos bet kuriais farmacijoje žinomais būdais. Visų metodų sudėtyje yra stadija, kurios metu veiklioji medžiaga sujungiama su nešėju, kuriame yra vienas arba keli pagalbiniai komponentai. Aplamai, vaistinė forma gaminama sumaišant veikliąją medžiagą su skystu nešėju arba

susmulkintu kietu nešėju, arba su abiem šiais nešėjais, ir, jei to reikia, suteikiant produktui reikiamą formą.

Vaistinės formos, tinkamos parenteraliam vartojimui, tai
5 paprastai sterilūs vandeniniai veikliosios medžiagos
tirpalai, kurie dažniausiai yra izotoniški paciento kraujo
atžvilgiu. Šios vaistinės formos gali būti lengvai
pagamintos ištirpinus vandenyje kietą veikliąją medžiagą, ir
sterilizavus gautą tirpalą pateikti jį kaip tokią arba
10 išfasuoti į multidozinius konteinerius, pvz., užlydytas
ampules arba flakonus.

Čia minimas EPO/kDNR žymi brandų EPO/kDNR geną, esanti
priešais ATG kodoną ir EPO/kDNR, koduojanti EPO baltymo
15 alelinius variantus. Viena iš alelių parodyta Lentelėse 2 ir
3. EPO baltymas apima 1-metionino darinį (Met-EPO) ir EPO
baltymo alelinius variantus. Brandus EPO baltymas, kurio
seka pateikta Lentelėje 2, prasideda tokia seka:
Ala-Pro-Pro-Arg-.... Sekos pradžia žymima skaičiumi „1“.
20 Met-EPO prasideda tokia seka: Met-Ala-Pro-Pro-Arg-....

Toliau pateikiami pavyzdžiai, kurie padeda suprasti šio
išradimo esmę. Visa išradimo apimtis yra pateikta išradimo
apibrėžtyje. Suprantama, kad pateikiamose metodikose gali
25 būti modifikacijų, tačiau jos neiškraipo išradimo esmės.
Visos temperatūros pateiktos Celsijaus laipsniais ir yra
netaisytos. Sąvokos „mikronas“ arba „mikro“ žymimos μ ,
pavyzdžiui, mikrolitras, mikromolis ir pan. yra „ μ l“, „ μ m“
ir pan.

30

PAVYZDŽIAI

Pavyzdys 1: EPO genomino klono išskyrimas

35 EPO buvo išskirtas iš pacientų, sergančių aplastine anemija,
šlapimo pagal anksčiau aprašytą metodiką (Miyake, et al., J.
Biol. Chem., 252:5558 (1977)), išskyrus tai, kad vietoj

apdorojimo fenoliu preparatas laikomas 80°C 5 minutes, siekiant inaktyvuoti neuraminidazę. Galutinė gryninimo stadija - frakcionavimas per Vydac HPLC kolonėlę (Separation Group), naudojant acetonitrilo su 0.1% trifluoracto rūgštimi
5 gradientą nuo 0 iki 95% per 100 minučių. EPO ištekėjimo vieta gradiente buvo nustatyta analizuojant pagrindinius pikus elektroforeze gelyje ir nustatant N galo seką

EPO išteka esant maždaug 53% acetonitrilo ir sudaro maždaug 40% nuo visų baltymų, leistų į atvirkštinės fazės chromatografiją. Frakcijos, kuriose yra EPO, sukonzentruotos
10 iki 100 µl, pH koreguotas iki 7.0, pridedant amonio bikarbonatą, ir preparatas suskaldomas, veikiant 2% tripsinu, apdorotu TPCK, (Worthington) 18 valandų esant 37°C. Triptinių peptidų mišinys buvo frakcionuojamas
15 atvirkštinės fazės HPLC, kaip tai aprašyta aukščiau. Registruojamas optinis tankis prie 280 ir 214 nm. Gera atsiskyrę pikai surenkami, išdžiovinami iki sausumo ir analizuojama N galo seką, naudojant Applied Biosystems Model 480 A dujų fazės sekvenatorių. Lentelėse 2 ir 3
20 nustatytos sekos pabrauktos. Kaip tai aprašyta aukščiau, du tokie triptiniai fragmentai buvo atrinkti oligonukleotidų zondu gamybai.

Remiantis seka Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys (amino rūgštys
25 nuo 46 iki 52 Lentelėse 2 ir 3), buvo susintetintas 17-meras, išsigimęs 32 kartus,

TTCCANGCGTAGAAGTT

30 ir 18-meras, išsigimęs 128 kartus,

CCANGCGTAGAAGTTNAC.

Remiantis seka Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg (amino rūgštys
35 nuo 144 iki 150 Lentelėse 2 ir 3), buvo susintetintos dvi grupės 14-merų, kiekviena iš jų išsigimusi 32 kartus

TACACCTAACTTCCT ir TACACCTAACTTCTT,

kurios skiriasi pirma leucino kodono padėtimi.
Oligonukleotidai buvo pažymėti 5' gale ^{32}P , naudojant
5 polinukleotidkinazę (New England Biolabs) ir γ ^{32}P -ATP (New
England Nuclear). Oligonukleotidų specifinis aktyvumas buvo
nuo 1000 iki 3000 Ci/mmol oligonukleotidui. Buvo atliktas
žmogaus genomo DNR bibliotekos λ bakteriofage (Lawn et al.,
Cell, 15:1157, 1978) skyringas, naudojant in situ amplifi-
10 kacijos metodiką, kurią pirmą kartą aprašė Woo et al.,
(Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 75:3688, 1978). Maždaug 3.5×10^5
fagų talpinama į Petri lėkštes (po 6000 fagų į 150
mm skersmens lėkštelę) su NZCYM terpe ir inkubuojama esant
37°C tol, kol atsiranda mažos, bet pastebimos dėmės (maždaug
0.5 mm skersmens). Atvėsinama iki 4°C ir išlaikoma 1 valandą
šioje temperatūroje. Dvigubos dėmių replikos perkeliama ant
nailono membranų (New England Nuclear) ir inkubuojamos per
naktį esant 37°C lėkštelėse su šviežia NZCYM terpe. Filtrai
denatūruojami ir neutralizuojami išlaikant kiekvieną 10
minučių ploname sluoksnyje tirpalo, sudaryto iš atitinkamai
0.5 N NaOH - 1 M NaCl ir 0.5 M Tris (pH 8) - 1M NaCl.
Filtrai kaitinami 2 valandas esant 80°C, plaunami 5 kartus
SSC tirpalu, 0.5% NDS 1 valandą. Ląstelių liekanos
pašalinamos švelniai braukiant drėgnu audiniu. Toks
braukymas sumažina zondo foninį sukibimą su filtru. Po to
filtrai perplaunami vandeniui ir prehibridizuojami nuo 3 iki 4
valandų esant 48°C 3M tetrametilamonio chloride, 10 mM NaPO_4
(pH 6.8) tirpale, 5-kartiniam Denhardt'o tirpale, 0.5% NDS
ir 10 mM EDTA tirpale. Po to pridedamas ^{32}P žymėtas 17-meras
(koncentracija 0.1 pmol/ml) ir hibridizacija tęsiama 72
valandas esant 48°C. Po hibridizacijos filtrai ilgai
plaunami dukartiniam SSC (0.3 M NaCl - 0.03 M Na citratas,
pH 7) esant kambario temperatūrai ir 1 valandą 3M TMACl - 10
mM NaPO_4 (pH 6.8) esant kambario temperatūrai ir nuo 5 iki
15 minučių esant hibridizacijos temperatūrai. Maždaug 120
stiprių dvigubų signalų buvo aptikta po 2 dienas trukusios
autoradiografijos, naudojant intensyvinašį ekraną. Teigiami
signalai buvo surinkti, sugrupuoti po 8, užnešti ir

pakartotinai atliktas skryningas su trimis pakartojimais, naudojant pusę 14-merų grupės ant kiekvieno iš dviejų filtrų ir 127-merą ant trečiojo filtro. 17-mero užnešimo ir hibridizacijos metodika buvo tokia pati, kaip aprašyta aukščiau, išskyrus tai, kad 14-mero hibridizacija vyko esant 37°C. Po autoradiografijos zondas pašalinamas iš filtro su 17-meru, laikant jį 50% formamide 20 minučių kambario temperatūroje ir filtras rehibridizuojamas esant 52°C su 18-mero zonu. Du nepriklausomi fagai hibridizuojami su visais trim zondais. Vieno iš šių fagų DNR (čia žymima λ HEP01) visiškai suskaldyta veikiant Sau3A ir subklonuota į M13, siekiant panaudoti ją DNR sekos analizei dideoksi grandinės užbaigimui pagal Sanger ir Coulson (Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 74:5463, 1977). Čia taip pat aprašyta atviro skaitymo rėmelio, koduojančio EPO triptinį fragmentą (pabrauktas regionas), nukleotidų seka ir pagal ją numatyta amino rūgščių seka. Introno sekos žymimos mažomis raidėmis, egzono sekos (87 nt) - didžiosiomis raidėmis. Sekos, kurios atitinka konsensuso splaisingo akceptoriaus (a) ir donoro (b) saitus, yra pbrauktos (žr. Lentelę 4).

Pavyzdys 2: Žmogaus gemalo kepenų mRNR Northern bloto analizė

Agarozės (0.8%) formaldehido gelyje atliekama elektroforezė su 5 µg žmogaus gemalo kepenų mRNR (paruoštų iš 20 savaičių gemalo kepenų) ir suaugusio žmogaus kepenų mRNR ir perkeliama ant nitroceliuliozinio filtro, naudojant Derman et al., metodą (Cell, 23:731 (1981)). Paruošiamas viengrandis zondas iš M13 pavyzdžio, kuriame yra intarpas, pateiktas Lentelėje 1. Praimeriu pasirinktas 20-meras pagal tą patį triptinį fragmentą, kaip ir originalus 17-mero zondas. Zondas paruošiamas pagal Anderson et al., (Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 80:6836-6842, 1983), išskyrus tai, kad po skaldymo, veikiant Smal (kurio metu susidaro reikiamas 95 nt ilgio zondas, turintis 74 nt koduojančią seką), mažasis fragmentas atskiriamas nuo M13 pavyzdžio chromatografuojant per Sepharose C14B koloną su 0.1N NaOH-0.2M NaCl. Filtras hibridizuojamas kol zondo aktyvumas pasiekia maždaug 5×10^5 impulsų per minutę.

(cpm) (12 valandų esant 68°C), perplaunamas dukartiniam SSC esant 68°C ir eksponuojamas 6 dienas su intensyvinančiu ekranu. Šalia esančioje juostoje leidžiamas mRNR vienos dėmės (1200 nt) markeris, pažymėtas rodykle (Fig. 1).

5

Pavyzdys 3: Gemalo kepenų kDNR

Paruošiamas zondas, identiškas aprašytam Pav. 2, ir juo atliekamas skryningas gemalo kepenų kDNR bibliotekos, paruoštos vektoriuje λ -Ch21A (Toole et al., Nature in Press, (1984), naudojant standartines lizės dėmių skryningo (Benton Davis, Science 196:180-182, 1977) procedūras. Atlikus skryningą su 1×10^6 lizės dėmių, išskirti trys nepriklausomi teigiami klonai (žymimi λ -HEPOFL6 (135 bp), λ -HEPOFL8 (700 bp) ir λ -HEPOFL13 (1400 bp). Visas λ -HEPOFL13 ir λ -HEPOFL6 tarpas buvo nusekvenuotas, atlikus subklonavimą į M13 (Lentelės 7 ir 5, atitinkamai). Intarpo λ -HEPOFL8 buvo nusekvenuoti tik atskiri fragmentai - buvo nuspręsta, kad liekana yra identiška kitiems dviems klonams (Lentelė 6). 5' ir 3' netransliuojamos sekos žymimos mažomis raidėmis. Koduojantis regionas žymimas didžiosiomis raidėmis.

Pagal Lentelės 2 ir 3, numatoma amino rūgščių seka yra pateikta po nukleotidų seka ir sunumeruota, pradedant nuo pirmos brandaus baltymo amino rūgšties. Spėjamas lyderinis peptidas amino rūgščių sekoje pažymėtas didžiosiomis raidėmis. Cisteino liekanos brandaus baltymo sekoje papildomai pažymėtos SH, o N glikozilinimo vietos - žvaigždute. Pabrauktos amino rūgštys žymi liekanas, kurios nustatytos sekvenuojant baltymo N galą arba sekvenuojant EPO triptinius fragmentus, kaip tai aprašyta Pavyzdyje 1. Pabraukimai punktyru žymi tas liekanas triptiniuose fragmentuose, kurios negali būti nustatytos vienareikšmiškai. kDNR klonai λ -HEPOFL6, λ -HEPOFL8 ir λ -HEPOFL13 deponuoti Amerikos tipų kultūrų kolekcijoje (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland);

MetGlyValI118G

[illegible]

1500
 1650
 1800
 1950
 2100
 2250

depozito numeriai (accession numbers) ATCC 40156, ATCC 40152 ir ATCC 40156, atitinkamai.

Pavyzdys 4: EPO geno genomo struktūra

5 Keturių nepriklausomų genominių klonų (λ -HEP01, 2, 3 ir 6) santykiniai dydžiai ir lokalizacija HAeIII/AluI bibliotekoje parodyta persiklojančiomis linijomis Fig. 3. Pastorinta linija žymi EPO geno lokalizaciją. Parodytas mastelis (Kb)

10 ir žinomų restrikcijos endonukleazų skaldymo vietų padėtys. Abi regiono, kuriame yra EPO genas, grandys buvo visiškai sekvenuotos, naudojant ekzonukleazės III generuotas delecijų serijas šiame regione. Penkių ekzonų, koduojančių EPO mRNR, išsidėstymo schema pateikta Fig. 4. Tiksliai ekzono I 5' riba

15 šiuo metu nežinoma. Ekzono dalis, koduojanti baltymą, užstrichuota. Visa regiono nukleotidų seka pateikta Lentelėje 4. Kiekvieno ekzono žinomos ribos pažymėtos vertikaliais brūkšniais. Genominiai klonai λ -HEPOFL1, λ -HEPOFL2, λ -HEPOFL3 ir λ -HEPOFL6 deponuoti Amerikos tipų

20 kultūrų kolekcijoje (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland); depozito numeriai (accession numbers) ATCC 40154, ATCC 40155, ATCC 40150 ir ATCC 40151, atitinkamai.

25 Pavyzdys 5: Vektoriaus p91023 (b) konstrukcija

Transformacijos vektoriumi buvo naudojamas pAdD26SVpA(3), kuri aprašė Kaufman et al., Mol.Cell. Biol., 2;1304 (1982). Šio vektoriaus struktūra pateikta Fig. 5A. Trumpai kalbant,

30 šioje plazmidėje yra pelės dihidrofolatreduktazės (DFHR) kDNR genas, kurio transkripciją kontroliuoja adenoviruso 2 (Ad2) pagrindinis vėlyvasis promotorius. 5' splaisingo vieta pažymėta adenoviruso DNR, o 3' splaisingo vieta, numatyta pagal imunoglobulino geną, yra tarp Ad2 pagrindinio vėlyvojo

35 promotoriaus ir DFHR koduojančios sekos. Ankstyvasis SV40 poliadenilavimo saitas yra žemiau DHFR koduojančios sekos. pAdD26SVpA(3) prokariotinė dalis yra iš pSV0d (Mellon et

[illegible][illegible]

Lentelė 5 (tesinys)

	150	160
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala	CTC TTC CGA CTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GCA AAG CTG AAG CTC TAC ACA GCG GCC	
SH Cys Arg Thr Gly Asp Arg	166 TGC ACG ACA CGG GAC ACA TCA ccaggtg	
gcttggtcca	caacctcccc	cgccactcct
ccatggacac	tccagtgcca	gcaatgacat
tctaaggatg	tcacagggcc	aacttgaggg
ggacagagcc	atgctgggaa	gacggcctgag
ttggaggcga	tttacctgtt	ttcgcacctg
ctgtgacttc	tccagggttc	acggggcatgg
gtggggaacca	tgaagacaggg	atggggggctg
aacctcatg	ncaagaactg	naaccacca
		naaaaaaaaaa

Lentelė 6

ccccggccc

ctcgtctgccc	tgcgcgcgcac	cgcgcctgtcc	tccccggagccc	ggaccggggggc	caccgcgcgcc	gctctgtctccc	acaccgcgcgc
ccctggacag	ccgcctctctc	ctccagggccc	gtgggggctgg	ccctgcaccc	ccgagcttcc	cgggatgagggg	cccccggtgt
ggtcaccccgg	cgcgcgcgcag	gtcgtctgagg	gacccccggccc	agggcggggag	-27 MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO ATG GGG CTC CAC GAA TGT CCT		
ALA TRP LEU CTG TGG CTT	LEU LEU SER LEU LEU LEU SER LEU PRO	CTG CTG TCC CTG CTG CTG TCG CTC CCT					
GCC TGG CTG	CTC CTC CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG						
1	SH	10					
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu							20
GCC CCA CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC GAC GAC GAC GAC							Lys AAG
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr							40
GAG GCC GAG AAT ATC ATC ACC ACC ACC ACC ACC ACC							Thr ACT
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Thr Asn Thr Tyr Ala							60
CTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TTC TAT TAT TAT TAT							Ala GCC
Val Glu Val Trp Trp Gln Gln Gly GGC CTC GGC GGC GGC							80
CTA GAA CTC TGG TGG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG							Leu CTG

Lentelė 7

ccccccgagcc	ggagccgggggc	caccgagccc	gctctgctccg	acaccgagcc
ccctggagacag	cgcccccctc	ctccagggccc	gtgggggctgg	ccctggcaccg
ggcgcgcgcg	cgccgccccag	gtccgctgggg	gaccccgggcc	agccgccccag
ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY	GGC TCG CTC TCG CTT CTC CTC TCC CTC CTC TCC CTC CCT CTC GCG CTC CCA CTC GCG			
1	Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys	SH 10		20
GGC CCA CCA CCG CTC ATC TGT GAC AGC CCA GTC CTG GAG AGC TAC CTC TTG GAG GCG				MC
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr	GAG GCC GAG AAT ATC ACG ACG GCG TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC	* SH 30 SH		40
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Tyr Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala	GTC CCA GAC ACC AAA CTT AAT TTC TAT GCC TGG AGC AGC ATG GAG CTC GCG CAG CAG	50		60
Val Glu Val Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu	CTA GAA GTC TGC CAG GCG CTC GCG CTC CTC TCG GAA GCT CTC CTC GCG GCG CAG GCG	70		80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Lys Ala Val	TTG CTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG CAG CCC CTG CAG CTC CAT CTC GAT AAA GCG CTC	* 90		100
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser	GCG CTT CCG AGC CTC ACC ACT CTC CTT CCG GCT CTG GGA CCC CAG AAC GAA GCG ATC TCC	110		120

Lentelė 7 (tęsinys)

130

130												140						
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg
CTT	CCA	GAT	GCG	GCC	TCA	GCT	GCT	CCA	CTC	CGA	ACA	ATC	ACT	GCT	GAC	ACT	TTC	CGC

150

150										150									
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
C ¹⁴ C	TTC	CGA	GTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGG	GGA	AAG	CTG	AAG	CTG	TAC	ACA	GGC	GAG	GCC

115 991 166

Cys Arg Thr Gly Asp Arg

TCC ACC ACA GCG GAC ACA

cccrccccc
cccrccccc

ccatggacac tccagtggcca

[illegible]

ggacagagcc atgctgggaa

11810000 11810000

ccaggtctt cttgacttc

საქართველოს

www.mca.com

33

LT 3944 B

al., Cell, 27:279 (1981)). Jos sudėtyje nėra pBR322 sekų, kurios, kaip žinia, inhibuoja replikaciją žinduolių ląstelėse (Lusky et al., Nature, 293:79(1981)).

- 5 pAdD26SVpA(3) buvo konvertuota į plazmidę pCVSVL2, kaip tai parodyta Fig. 5A. pAdD26SVpA(3) konvertuota į plazmidę pAdD26SVpA(3) (d), deletuojant vieną iš dviejų PstI saitų plazmidėje pAdD26SVpA(3). Tai padaryta nepilnai suskaldant plazmidę restriktaze PstI, pasinaudojus šio fermento
- 10 deficitu. Taip gaunama linijinių plazmidžių subpopuliacija, kai tik vienas PstI saitas suskaldytas. Po to veikiama Klenow fragmentu, liguojama, siekiant gauti žiedines plazmides. PstI saito delecijos skryningas leidžia ją lokalizuoti tarp 3' ir SV40 poliadenilavimo sekų.
- 15
- Adenoviruso lyderio, sudaryto iš trijų dalių, ir viruso asocijuoti genai (VA genai) įterpti į pAdD26SVpA(3) (d), kaip tai parodyta Fig. 5A. Iš pradžių pAdD26SVpA(3) (d) skaldoma su PvuII, siekiant perkirsti ją 3' regione, kuriame
- 20 yra trys elementai, sudarantys trijų dalių lyderį. Po to pJAW 43 (Zain et al., Cell, 16:851 (1979)) skaldomas su XhoI, veikiamas Klenow fragmentu, skaldomas PvuII, ir 140 bp fragmentas, turintis trečiojo lyderio antrąją dalį išskiriamas elektroforezės akrilamido gelyje būdu (6% Tris
- 25 borato buferyje; Maniatis et al., supra). Po to 140 bp fragmentas liguojamas su pAdD26SVpA(3) (d), suskaldytu PvuII. Ligavimo produktas panaudojamas transformuoti E. coli į atsparų tetraciklinui kloną. Atliekamas kolonijų skryningas pagal Grunstein-Hogness metodiką, naudojant ³²P
- 30 žymėtą zoną, kuris hibridizuojasi su 140 bp fragmentu. DNR, pagamintas iš teigiamai hibridizuojančių kolonijų, buvo analizuojamas, siekiant nustatyti, ar rekonstruotas PvuII saitas iš 140 bp DNR yra 5' ar 3' adenoviruso antrojo ir trečiojo vėlyvojo lyderio atžvilgiu. Plazmidė yra žymima
- 35 tTPL ir parodyta Fig. 5A.

SV40 AvaIID fragmentas, turintis SV40 sustiprinančią seką, gaunamas skaldant SV40 DNR su AvaII, sulyginant galus su PolI Klenow fragmentu, liguojant XhoI linkerius su fragmentais, skaldant su XhoI ir taip atidarant XhoI saitą
5 ir išskiriant ketvirtą didžiausią (D) fragmentą elektroforezės būdu. Šis fragmentas po liguojamas su pTPL, suskaldytu XhoI, ir gaunama plazmidė pCVSVL2-TPL. SV40 D fragmento orientacija plazmidėje pCVSVL2-TPL yra tokia, kad SV40 vėlyvasis promotorius yra taip pat orientuotas kaip ir
10 adenoviruso pagrindinis vėlyvasis promotorius.

Siekiant įterpti genus, asocijuotus su adenovirusu (VA), į pCVSVL2-TPL, iš pradžių buvo sukonstruota plazmidė pBR322, kurios sudėtyje yra 2-o tipo adenoviruso Hind III
15 B fragmentas. 2-o tipo adenoviruso DNR skaldoma su HindIII ir B fragmentas išskiriamas elektroforezės gelyje būdu. Šis fragmentas įterpiamas į pBR322, kuri prieš tai suskaldoma HindIII. E. coli transformuojama į ampicilinui atsparų kamieną. Atliekamas rekombinantų skyringas, siekiant
20 nustatyti, ar įterptas HindIII B fragmentas, o jo orientacija nustatyta skaldant restrikcijos endonukleazėmis. Plazmidės pBR322 - Ad HindIII B sudėtyje yra 2-o tipo adenoviruso HindIII B fragmentas, kurio orientacija pateikta Fig. 5B.

25 Kaip parodyta Fig. 5B, VA genus patogų gauti iš plazmidės pBR322 - Ad HindIII B, skaldant ją Hpa I, pridedant EcoRI linkerius ir skaldant su EcoRI, o po to išskiriant 1.4 kb fragmentą. Fragmentas, turintis EcoRI lipnius galus, po to
30 liguojamas į PTL EcoRI saitą, kuris prieš tai suskaldomas EcoRI. E. coli HB101 transformuojama ir atrenkama atsparios tetraciklinui kolonijos, su kuriomis atliekamas filtrinės hibridizacijos skyringas, siekiant nustatyti DNR, specifines VA genams. DNR buvo susintetintos iš teigiamai
35 hibridizuojančių klonų ir apibūdintos, skaldant restrikcijos endonukleazėmis. Gauta plazmidė žymima p91023.

Abu EcoR1 saitai p91023, kaip parodyta Fig. 5C, buvo pašalinti visiškai suskaldant p91023 su EcoR1. Gaunami du DNR fragmentai: vienas maždaug 7 kb ir kitas maždaug 1.3 kb. Pastarajame fragmente yra VA genai. Abiejų fragmentų galai
5 buvo sulyginti naudojant PolI Klenow fragmentą ir jie liguojami vienas su kitu. Gaunama plazmidė p911023 (A), turinti yra VA genus, kuri panaši į p91023, išskyrus tai, kad joje nėra abiejų EcoR1 saitų. Ši plazmidė identifikuojama naudojantis Grunstein-Hogness skryningo
10 metodu su Va geno fragmentu ir standartine restrikcijos saitų analize.

Vienas PstI saitas, esantis plazmidėje p91023(A) pašalinamas ir pakeičiamas EcoR1 saitu. p91023(A) visiškai suskaldoma
15 PstI ir veikiama PolI Klenow fragmentu, siekiant gauti lygius galus. EcoR1 linkeriai liguojami su p(1023(A) bukuoju PstI saitu. Tiesinė p91023(A) su prijungtais prie buko PstI saito EcoR1 linkeriais buvo atskirta nuo neliguotų linkerių, visiškai suskaldyta EcoR1 ir vėl liguota. Gaunama plazmidė
20 p91023 (B), parodyta Fig. 5C, kurios struktūra panaši į p91023(A), tačiau vietoje EcoR1 saito yra anksčiau buvęs PstI saitas. Plazmidė p91023(B) deponuota ir ją galima gauti Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39754.

25

Pavyzdys 6:

Į plazmidę p91023(B) įterpiami kDNR klonai (λ -EPOFL6 ir λ -EPOFL13; Fig. 3) ir susidaro atitinkamos plazmidės pPTFL6 ir
30 pPTFL13. 8 μ g kiekvienos išgrynintos DNR buvo panaudota COS ląstelių (5×10^6) transfekcijai, naudojant DEAE-dekstrano metodą (žr. žemiau). Po 12 valandų ląstelės perplaunamos ir veikiamos 2 valandas Chlorochinu (0.1 mM), vėl perplaunamos ir paliekamos 24 valandoms terpėje (10 ml), kurioje yra 10%
35 veršelio fetalinio serumo. Po to terpė keičiama neserumine terpe (4 ml) ir išlaikoma 48 valandas.

Imunologiškai aktyvaus EPO gaminamas kiekis išmatuojamas kiekybiškai RIA metodu, kuris aprašytas Sherwood ir Goldwasser (Blood 54:8885-893, 1979). Antikūniai gauti iš Dr. Judith Sherwood. Jodo preparatas pagamintas iš
 5 homogeninio EPO, aprašyto Pav. 1. Šio testo jautrumas yra maždaug 1 ng/ml. Rezultatai pateikti žemiau Lentelėje 8.

Lentelė 8

<u>Vektorius</u>	EPO kiekis, atpalaiduojamas į terpę (ng/ml)
pPTFL13	330
pPTFL6	31

10

Plazmidė pPTFL13 deponuota ir ją galima gauti Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39990.

15 Pavyzdys 7.

EPO KDNR (λ -HEPOFL13) įterpiama į p91023(B) vektorių ir transfekuojama į COS-1 ląsteles. Kultivavimo sąlygos tokios pačios, kaip aprašyta Pav. 6, išskyrus tai, kad praleidžiama
 20 chlorochino stadija.

EPO biologinis aktyvumas in vitro buvo matuojamas naudojant kolonijų formavimo testą su pelės gemalo kepenų ląstelėmis kaip CFU-E šaltiniu arba ^3H -timidino įsisavinimo testą,
 25 naudojant pelių, kurioms suleista fenilhidrazino, blužnies ląsteles. Šių testų jautrumas yra maždaug 25 milivienetai/ml.

EPO biologinis aktyvumas in vivo buvo matuojamas naudojant
 30 hipoksinių pelių arba badaujančių žiurkių metodą. Šių testų jautrumas yra maždaug 100 milivienetai/ml. Kontrolinėje terpėje nerasta jokio aktyvumo. Matavimų rezultatai, gauti EPO, kuris ekspresuotas klone EPOFL13, pateikti žemiau

Lentelėje 9. Čia pateikti aktyvumai išreikšti vienetais/ml, naudojant kaip standartą komercinį, apibrėžtos sudėties EPO (Toyobo, Inc.).

5

Lentelė 9

EPO, sekretuojamas iš ląstelių, kurios transfekuotos I tipo EPO kDNR

Testas	Aktyvumas	
RIA	100	ng/ml
CFU-E	2	0.5 vienetai/ml
³ H-Thy	3.1	1.8 vienetai/ml
hipoksinės pelės	1	vienetai/ml
badaujančios žiurkės	2	vienetai/ml

10

Pavyzdys 8: EPO iš COS ląstelių analizė NDS poliakrilamidiniame gelyje

- 15 180 ng EPO, kuri sekretuoja į terpę COS ląstelės, transfekuotos EPO (λ -HEPOFL13) kDNR į vektorių 91023(B) (aprašytas aukščiau) analizuojama elektroforezės būdu 10% NDS Laemlli poliakrilamidiniame gelyje ir perkeliama elektriniu būdu ant nitroceliuliozės popieriaus (Towbin et
- 20 al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350 (1979)). Filtras testuojamas su anti-EPO antikūnais kaip aprašyta Lentelėje 8, perplaunamas ir vėl testuojamas su ¹²⁵I-stafilokoko A baltymu. Filtras autoradiografuojamas 2 dienas. Natyvus homogeninis EPO, aprašytas Pvz. 1, analizuojamas
- 25 elektroforezės būdu prieš jodavimą (takelis B) arba po jodavimo (takelis C) (žr. Fig. 6). Naudojami markeriai - ³⁵S metioninas, serumo albuminas (68 000d) ir ovalbuminas (45 000 d).

Pavyzdys 9. RKI-4 konstrukcija

Iš plazmidės PSV2DHFR (Subramani et al., Mol.Cell.Bio. 1:854-864 (1981)) buvo išskirtas Bam HI-PvuII fragmentas, turintis SV40 ankstyvąjį regiono promotorių, esantį šalia pelės dihidrofolatreduktazės (DHFR) geno, SV40 stiprintuvą, mažą t antigeno introną ir SV40 poliadenilavimo seką (fragmentas A). Kiti fragmentai gauti iš vektoriaus p91023(A) (žr. aukščiau) taip: p91023(A) skaldoma PstI ties vieninteliu PstI saitu, esančiu šalia adenoviruso promotoriaus, siekiant linearizuoti plazmidę, o po to liguoti su sintetiniu PstI - EcoRI konverteriu ir vėl uždaryti žiedą (taip sukuriama saitai PstI - EcoRI - PstI originalaus PstI saito vietoje; 91023(B')) arba ši plazmidė veikiama dideliu DNR polimerazės I fragmentu, siekiant suardyti PstI saitus, ir liguojama su sintetiniu EcoRI linkeriu ir uždaromas žiedas (taip sukuriamas EcoRI saitas vietoj originalaus PstI saito; 91023(B)). Kiekviena gauta plazmidė - 91023(B') ir 91023(B) - skaldoma Xba ir EcoRI, siekiant gauti du fragmentus (F ir G). Sujungiant fragmentą F iš 91023(B) su fragmentu G iš 91023(B') ir fragmentą G iš 91023(B) su fragmentu F iš 91023(B'), sukuriamos dvi naujos plazmidės, kuriose yra EcoRI - PstI saitas arba PstI -EcoRI saitas vietoj originalaus PstI saito. Plazmidė, kurioje PstI - EcoRI saite PstI saitas yra arčiausiai vėlyvojo pagrindinio adenoviruso promotoriaus, žymima p91023(C).

Vektorius p91023(C) pilnai suskaldomas restriktaze XhoI ir gautos linearizuotos DNR, kurių lipnūs galai sulyginami, naudojant didelį DNR polimerazės I iš E. coli fragmentą. Su tokia DNR liguojamas 340 bp HindIII - EcoRI fragmentas, turintis SV40 stiprintuvą, susintetintą taip:

HindIII - PvuII fragmentas iš SV40, turintis SV40 originalą arba jo kopiją, įterpiamas į plazmidę c lac (Little et al., Mol. Biol. Med. 1:473-488 (1983)). Vektorius c lac buvo susintetintas skaldant DNR su BamHI, sulyginant lipnius

galus, naudojant didelį DNR polimerazės I fragmentą ir skaldant DNR su HindIII. Gauta plazmidė (c SVHPlac) vėl turi BamHI saitą, liguojant su bukuoju PvuII galu. EcoRI - HindIII fragmentas susintetintas iš c SVHPlac ir liguojamas su EcoRI - HindIII fragmentu iš PSVOd (Mellon et al., žr. 5 aukščiau), kuriame yra originali plazmidė arba jos kopija. Pasirenkama gauta plazmidė pSVHPOd. Sintetinamas EcoRI - HindIII 340 bp fragmentas, kuriame yra SV40 originalas arba stiprintuvas, abu galai sulyginami, naudojant didelį DNR 10 polimerazės I fragmentą, ir liguojami su aukščiau aprašytu, XhoI suskaldytu, sulygintais galais vektoriumi p91023(c). Gauta plazmidė (p91023(C)/Xho/buki galai + EcoRI/HindIII/SV40 su bukais galais + stiprintuvas), kurioje HindIII - EcoRI fragmentas buvo toks, kad BamHI saitas jame 15 artimiausias VA genui, žymima pES105. Plazmidė pES105 skaldoma su BamHI ir PvuII ir tik su PvuII, po to išskiriamas BamHI - PvuII fragmentas, kuriame yra adenoviruso pagrindinis vėlyvasis promotorius (fragmentas B), PvuII fragmentas, turintis atsparumo tetraciklinui geną 20 ir kitos sekos (fragmentas C). Fragmentai A, B ir C liguojami ir gauta plazmidė, parodyta Fig. 7, išskirta ir pažymėta RK1-4. Plazmidė RK1-4 deponuota Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39940.

25

Pavyzdys 10: EPO ekspresija CHO ląstelėse (I-as būdas)

DNR (20 µg) iš plazmidės pPTFL13, kuri aprašyta aukščiau (Pvz. 6), skaldoma su restrikcijos endonukleaze ClaI, 30 siekiant linearizuoti plazmidę ir liguojama su plazmidės pAdD26SVp(A) 1 (2 µg) DNR, kuri suskaldyta su ClaI, ir kurioje yra nepažeistas dihidrofolatreduktazės (DHFR) genas, kontroliuojamas adenoviruso pagrindinio vėlyvojo promotoriaus (Kaufman ir Sharp, Mol. and Cell Biol. 2:1304- 35 1319 (1982)). Taip liguota DNR buvo panaudota DHFR neigiamoms CHO ląstelėms transfekuoti (DUKX-BII, Chasin L.A. ir Urlaub G. (1980) PNAS 77 4216-4220), ir - praėjus dviems

dienoms nuo auginimo pradžios - ląstelės, turinčios bent vieną DHFR geno kopiją buvo atrinktos α -terpėje be nukleotidų, papildytoje 10% dializuotu fetaliniu jaučio serumu. Praėjus dviem savaitėms nuo auginimo pradžios, 5 selektyvioje terpėje, kolonijos išimamos iš pradinių lėkštelių, sugrupuojamos po 10-100 kolonijų, persėjamos ir auginamos iki susilieimo α -terpėje be nukleotidų. Terpių supernatantai prieš selekciją metotreksatu testuojami RIA metodu ieškant EPO. Grupės, kuriose rastas EPO, auginamos 10 terpėje su metotreksatu ($0.02 \mu\text{M}$), po to subklonuojamos ir pakartotinai analizuojamos. EPO Cla 4 4.02-7 pasirodė esanti vienintelė subklonuota iš EPO Cla 4 4.02 grupė, kuri atpalaiduoja 460 ng/ml EPO į terpę, turinčią $0.02 \mu\text{M}$ MTX (Lentelė 10). EPO Cla 4 4.02-7 yra pati geriausia ląstelių 15 linija EPO gamybai; ji deponuota Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC CRL8695. Šiuo metu atliekama šio klono laipsniška selekcija, didinant MTX koncentraciją - tai, kaip tikimasi, leis gauti ląsteles, pasižyminčias dar didesne EPO ekspresija. Grupėse, 20 kurios yra neigiamos RIA duomenimis, atrenkamos metotreksatui atsparios kolonijos iš atitinkamų kultūrų, kurios auginamos terpėje su metotreksatu ($0.02 \mu\text{M}$). Šiose kolonijose vėl nustatomas EPO RIA metodu. Neigiamos kultūros subklonuojamos ir toliau auginamos, didinant metotreksato 25 koncentraciją.

Laipsniška selekcija pagal metotreksatą (MTX) buvo pasiekta kartojant ląstelių kultivavimo terpėse su didėjančia metotreksato koncentracija ir likusių gyvų ląstelių 30 selekcijos ciklus. Kiekviename cikle buvo matuojamas EPO kiekis kultūros supernatante RIA metodu ir biologinis aktyvumas in vitro. Metotreksato kiekiai, naudojami kiekvienoje amplifikacijos stadijoje buvo $0.02 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ ir $0.5 \mu\text{M}$. Kaip parodyta Lentelėje 10, po 1 selekcijos ciklo 35 terpėje su $0.02 \mu\text{M}$ metotreksato į terpę sekretuojami žymūs kiekiai EPO.

Lentelė 10EPO kiekiai, sekretuojami į terpę

Pavyzdys	Testas	Surinkta α - terpėje	Surinkta α -terpėje su 0.02 μ M metotreksato
4 4 grupė	RIA	17 ng/ml	50 ng/ml
4 4 viena kolonija klonas (.02-7)	RIA	-	460 ng/ml

5

Pavyzdys 11: EPO ekspresija CHO ląstelėse - II-as metodas

DNR iš klono λ -HEPOFL13 skaldoma su EcoRI ir mažas RI fragmentas, turintis EPO geną, subklonuojamas į plazmidės

10 RK1-4 EcoRI saitą (žr. Pvz. 10). Ši DNR (RKFL13) naudojama tiesioginei (be skaldymo) DHFR-neigiamų CHO ląstelių transfekcijai. Selekcija ir amplifikacija atliekama kaip aprašyta aukščiau pateiktame Pvz. 10.

- 15 RKFL13 DNR į CHO ląsteles buvo įterpta ir kitais būdais - protoplastų sulydymu ir mikroinjekcija. Plazmidė RKFL13 deponuota Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39989.

Lentelė 11EPO kiekis, sekretuojamas į terpę

Pavyzdys	Testas	Surinkta α - terpėje	Surinkta α - terpėje su 0.02 μ M metotreksato
Kolonijs Grupė A	RIA	3 ng/ml	42 ng/ml (grupė)
	^3H -Thy	-----	150 ng/ml (klonas)
			1.5 VV/mm
Pavienė kolonija	RIA	-----	90 ng/ml
	^3H -Thy	-----	5.9 VV/ml
klonas (0.02C- Z)			
Mikroinjekcija grupėje	RIA	60 ng/ml	160 ng/ml
(DEPO)1)	^3H -Thy	1.8 VV/ml	-----

5

Geriausias atskiros kolonijos klonas buvo deponuotas Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC CRL8695.

10 Pavyzdys 12: EPO genominio klono ekspresija COS-1 ląstelėse

EPO genominio klono ekspresijai naudojamas vektorius pSV0d (Mellon et al., supra). DNR iš pSV0d pilnai suskaldoma su HindIII, jos galai sulyginami naudojant didį DNR polimerazės I fragmentą. EPO genominis klonas λ HEPO3 pilnai skaldomas su EcoRI ir HindIII, išskiriamas 4.0 kb fragmentas, turintis EPO geną, ir sulyginami jo galai, kaip aprašyta aukščiau. Šio fragmento nukleotidų seka nuo HindIII saito iki regiono virš poliadenilavimo signalo parodyta Fig. 4

4 Lentelėje 4. EPO geno fragmentas buvo įterptas į pSV0d plazmidės fragmentą ir taisyklingai sukonstruoti abiejų orientacijų rekombinantai buvo išskirti ir patikrinti.

20

Plazmidėje CZ2-1 EPO genas yra „a“ orientacijos (t.y. EPO 5' galas yra arčiausiai SV40 originalo), o plazmidėje CZ1-3 - priešingos orientacijos (orientacija „b“).

- 5 Plazmidės CZ1-3 ir CZ2-1 transfekuojamos į COS-1 ląsteles, kaip tai aprašyta Pvz. 7, terpė surenkama ir jooje nustatomas imunologiškai aktyvus EPO. CZ2-1 kultūros supernatante EPO rasta maždaug 31 ng/ml, CZ1-3 - 16-31 ng/ml.

10

Panašiu būdu į COS ląsteles gali būti įterpti genominiai klonai HEPO1, HEPO2 ir HEPO6.

Pavyzdys 13: Ekspresija C127 ir 3T3 ląstelių pBPVEPO
 15 konstrukcijoje

Konstruojama plazmidė, turinti EPO kDNR seką, kurią kontroliuoja pelės metalotioneino promotorius, ir sujungta su pilna jaučio papildomos viruso DNR.

20

pEPO49f

- Plazmidė SP6/5 gauta iš Promega Biotec. Ši plazmidė pilnai suskaldyta su EcoRI ir 1340 bp EcoRI fragmentas iš λ-
 25 HEPOFL13 įterpiamas naudojant DNR ligazę. Gauta plazmidė, kurios EPO geno 5' galas yra arčiausiai SP6 promotoriaus (pagal skaldymą su BglI ir HindIII), žymima pEPO49F. Šioje orientacijoje BamHI saitas PSP6/5 polilinkeris yra tiesiogiai prijungtas prie EPO geno 5' galo.

30

pMMTneo BPV

- Plazmidė pdBPV-MMTneo (342-12) (Law et al., Mol. and Cell Biol. 3:2110-2115 (1983)), parodyta Fig. 8, pilnai
 35 suskaldoma su BamHI ir gaujami du fragmentai - didelis maždaug 8 kb fragmentas, kuriame yra BPV genomas, ir mažesnis, maždaug 6,5 kb fragmentas, kuriame yra pML2

replikacijos originalas ir atsparumo ampicilinui genas, metalotioneino promotorius, atsparumo neomicinui genas ir SV40 poliadenilavimo signalas. Suskaldyta DNR sujungiama į žiedą veikiant ją DNR ligaze ir, skaldant su EcoRI ir BamHI
5 restrikcijos endonukleazėmis, identifikuojamos plazmidės, turinčios tik 6.8 kb fragmentą. Viena šių plazmidžių pažymėta pMMTneo BPV.

pEPO15a

10

pMMTneo BPV pilnai suskaldoma su BglII. pEPO49f pilnai suskaldoma su BamHI bei BglII ir maždaug 700 bp fragmentas, kuriame yra visas EPO koduojantis regionas, išskiriamas gelyje. pMMTneo BPV, suskaldytas BglII ir 700 bp
15 BamHI/BglII EPO fragmentas liguojami ir gautos plazmidės, turinčios EPO kDNR, identifikuojamos hibridizuojant kolonijas su oligonukleotido d(GGTCATCTGTCCCCTGTCC) zonu, kuris yra specifiškas EPO genui. Tarp teigiamai hibridizavusių plazmidžių skaldant su EcoRI ir KpnI
20 identifiikuota viena plazmidė (pEPO15a), kurioje EPO kDNR taip orientuotas, kad EPO kDNR 5' galas yra arčiausiai metalotioneino promotoriaus.

pBPV-EPO

25

Plazmidė pEPO15A linearizuojama pilnai suskaldant ją su BamHI. Taip pat pilnai suskaldoma pBPV-MMTneo-(342-12) plazmidė, veikiant ją BamHI, ir gaunami du fragmentai - 6.5 kb ir 8 kb. 8 kb fragmentas, kuriame yra visas jaučio
30 papilomos viruso genomas, išskiriamas gelyje. pEPO15a/BamHI ir 8 kb BamHI fragmentas liguojami vienas su kitu ir kolonijų hibridizavimo metodu, naudojant specifinį BPV genomui oligonukleotido d(P-CCACACCCGGTACACAC-OH) zoną, identifiikuojama plazmidė (pBPV-EPO), kurioje yra BPV
35 fragmentas. pBPV-EPO DNR skaldymas su HindIII parodė, kad BPV genomo transkripcijos kryptis yra tokia pati, kaip ir metalotioneino promotoriaus transkripcijos kryptis (taip pat

yra ir pdBPV-MMTneo(342-12), žr. Pav. 8). Plazmidę pdBPV-MMTneo(342-12) galima gauti Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 37224.

5

Ekspresija

EPO ekspresijai buvo naudojami žemiau aprašyti metodai.

10 Metodas I.

Susintetinta pBPV-EPO DNR ir maždaug 25 µg panaudojama $\sim 1 \times 10^6$ C127 (Lowy et al., J. of Virol. 26:291-98 (1978)) CHO ląstelių transfekcijai, naudojant standartinę kalcio fosfato nusodinimo metodiką (Grahm et al., Virology, 52:456-67 (1973)). Praėjus 5 valandoms po transfekcijos, pašalinama transfekcijos terpė, atliekamas glicerino šokas, ląstelės perplaunamos ir pridedama šviežia α -terpė, į kurią pridėta 10 % fetalinio jaučio serumo. Po 48 valandų ląstelės tripsinizuojamos, disperguojamos santykiu 1:10 DME terpėje, kurioje yra 500 µg/ml G418 (Southern et al., Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982)) ir inkubuojamos dvi tris savaites. Kolonijos, atsparios G418, išskiriamos individualiai, patalpinamos į mikrotitravimo šulinėlius ir auginamos iki susiliejo esant G418. Po to ląstelės perplaunamos, pridedama šviežia terpė, kurioje yra 10% fetalinio jaučio serumo ir po 48 valandų terpė surenkama. Apdorota terpė analizuojama ir RIA metodu bei in vitro biologiniu testu parodyta, kad ji yra teigiama EPO atžvilgiu.

30

Metodas II

C127 arba 3T3 ląstelės kotransfekuojamos su 25 µg pBPV-EPO ir 2 µg pSV2neo (Southern et al., supra) kaip tai aprašyta Metode I. Naudojamas maždaug 10-kartinis molinis pBPV-EPO perteklius. Po transfekcijos taikoma ta pati procedūra, kaip aprašyta Metode I.

Metodas III

C127 ląstelės transfekuojamos su 30 µg pBPV-EPO, kaip aprašyta Metode I. Po transfekcijos ir padalinimo (1:10) terpė keičiama kas trys dienos. Maždaug po 2 savaičių pasirodo BPV transformuotų ląstelių dėmės. Individualios dėmės surenkamos atskirai į 1 cm mikrotitravimo lėkštelės šulinėlius, auginamos iki susiliejančio monosluoksniu ir apdorotoje terpėje tikrinamas jų EPO aktyvumas arba antigeniškumas.

Pavyzdys 14: Ekspresija vabzdžių ląstelėse. pIVEV EPOFL13 konstrukcija

Plazmidės vektorius pIVEV deponuotas Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39991. Vektorius modifikuotas taip:

pIVEVNI

20

pIVEV skaldomas su EcoRI, siekiant linearizuoti plazmidę, galai sulyginami, naudojant didįjį DNR polimerazės I fragmentą ir vienas NotI linkeris

25 GGCGGCCGCC
CCGCGGCGG

įterptas liguojant bukąjį galą. Gauta plazmidė žymima pIVEVNI.

30

pIVEVSI

pIVEV skaldomas su SmaI, siekiant linearizuoti plazmidę, ir vienas SfiI linkeris

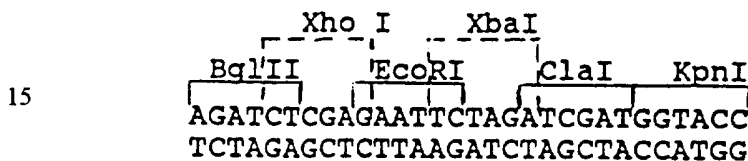
35

GGGCCCCAGGGGCC
CCCGGGTCCCCGGG

įterptas liguojant bukąjį galą. Gauta plazmidė žymima pIVEVSI.

5 pIVEVSI BgKp

Plazmidė pIVEVSI skaldoma su KpnI, siekiant ją linearizuoti, ir maždaug 0-100 bp pašalinama iš kiekvieno galo skaldant su dvigrande ekzonukleaze Bal31. Gauti galai sulyginami, naudojant didįjį DNR polimerazės I fragmentą, ir, liguojant bukąjį galą, įterpiamas polilinkeris



Gaunamos abi polilinkerio orientacijos. Plazmidė, kurioje polilinkeris orientuotas taip, kad BglIII saitas, esantis polilinkeryje, yra arčiausiai poliedrono geno promotoriaus, žymima pIVEVSI BgKp. Plazmidė, kurioje KpnI saitas, esantis polilinkeryje, yra arčiausiai poliedrono geno promotoriaus, žymima pIVEVSI KpBg. Bazių porų skaičius, kurios pašalintos iš regiono tarp originalaus KpnI saito pIVEVSI ir poliedrono promotoriaus, nebuvo nustatytas. pIVEVSI BgKp deponuota Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC), Rockville, Maryland, depozito Nr. ATCC 39998.

30 pIEVSI BgKpN1

pIVEVNI pilnai suskaldoma su KpnI ir PstI - gaunami du fragmentai. Didesnysis fragmentas, kuriame yra plazmidės originalo replikacija ir 3'galas, išskiriamas gelyje (fragmentas A). pIVEVSI BgKp pilnai suskaldoma su PstI ir KpnI - gaunami du fragmentai. Mažesnysis fragmentas, kuriame yra poliedrono geno promotorius ir polilinkeris, išskiriamas

gelyje (fragmentas B). Fragmentai A ir B sujungiami, naudojant DNR ligazę, ir susidaro nauja plazmidė pIVEVSIBgKpN1, kurioje yra iš dalies deletuotas poliedrono genas, į kurią įterptas polilinkeris, bei NotI saitas (vietoj suardyto EcoRI saito) ir SfiI saitas, kurie supa poliedrono geno regioną.

pIVEPO

10 pIVEVSI BGKpNI pilnai suskaldomas su EcoRI, siekiant linearizuoti plazmidę ir įterpiamas 1340 bp EcoRI fragmentas iš λ-HEPOFL13. Plazmidės, kuriose EPO genas yra taip orientuotas, kad EPO geno 5' galas yra arčiausiai poliedrono promotoriaus, o poliedrono geno 3' galas identifikuojamas
15 skaldant su BglII. Viena šių plazmidžių, pasižyminti aukščiau minėta orientacija, žymima pIVEPO.

EPO ekspresija vabzdžių ląstelėse

20 Transformuojant E. coli kamieną JM101-tgl, pagaminamas didelis kiekis pIVEPO plazmidės. DNR plazmidė išskirta naudojant skaidraus lizato metodiką (Maniatis ir Fritsch, Cold Spring Harbor Manual) ir po to valoma centrifuguojant CsCl gradientu. Poliedrozės viruso (AcNPV) Autographa
25 californica laukinio tipo kamieno L-1 DNR gaminama ekstrahuojant fenoliu viruso daleles ir po to gryninant virusinę DNR CsCl gradientu.

Šios dvi DNR kotransfekuojamos į Spodoptera frugiperda
30 ląsteles IPLB-SF-21 (Vaughn et al., In Vitro Vol. B, pp. 213-17 (1977)), naudojant kalcio fosfato transfekcijos procedūrą (Potter ir Miller, 1977). Kiekvienai lėkštei ko-
transfekuojamų ląstelių buvo naudojama kilpelė laukinio tipo AcNPV DNR ir 10µg pIVEPO. Lėkštelės inkubuojamos 5 dienas
35 esant 27°C. Surenkamas supernatantas ir EPO ekspresijos lygis jame nustatomas RIA metodu in vitro biologiniu testu.

Pavyzdys 15: EPO gryninimas

COS ląstelių terpė (12 l), kurioje EPO koncentracija yra iki 200 µg/l, koncentruojama iki 600 ml, naudojant 10 000 D
5 ultrafiltracijos membranas, pavyzdžiui, Millipore Pellicon aparatą su 5 kvadratinų pėdų membrana. Testuojama RIA metodu pagal metodiką, aprašytą Pvz. 6. Ultrafiltracijos retentatas diafiltruojamas prieš 4 ml 10 mM natrio fosfato buferio, pH 7.0. Sukoncentruotoje ir diafiltruotoje terpėje
10 rasta 2.5 mg EPO (bendras baltymas - 380 mg). Po to EPO tirpalas koncentruojamas iki 186 ml ir krentantys į nuosėdas baltymai pašalinami centrifuguojant 30 minučių esant 110 000 g.

15 Supernatanto, kuriame yra EPO (2.0 mg), pH koreguojamas iki 5.5 pridėdant 50% acto rūgštį, maišomas 30 minučių esant 4°C ir nuosėdos pašalinamos centrifuguojant 30 minučių esant 13 000 g.

20 Karboksimetilsepharose chromatografija

Supernatantas po centrifugavimo (20 ml), kuriame yra 200 µg EPO (bendras baltymas - 24 mg) užnešamas ant kolonėlės, užpildytos CM-Sepharose (20 ml). Kolonėlė nulygsvarinama
25 10mM natrio acetato tirpalu (pH 5.5), perplaunama 40 ml to paties buferio. EPO eliuojamas nuo CM-Sepharose su 100 ml NaU(0-1) gradiento 10 mM natrio fosfato tirpalo, pH 5.5. Surenkamos frakcijos, kuriose yra EPO (50 µg dviejuose mg bendro baltymo), gautas tirpalas koncentruojamas iki 2 ml
30 naudojant Amicon YM10 ultrafiltracijos membraną.

Atvirkštinės fazės HPLC

Sukoncentruotos frakcijos po CM-Sepharose, turinčios EPO,
35 toliau gryninamas atvirkštinės fazės HPLC, naudojant Vydac C-4 kolonėlę. EPO užnešamas ant kolonėlės, nulygsvarintos 10% elientu B (Elientas A - 0.1% CF₃CO₂H vandenyje;

eliuentas B - 0.1% CF₃CO₂H acetonitrile), srovės greitis 1 ml/min. Kolonėlė 10 minučių plaunama 10%-iniu B. EPO eliuojamas B tiesiniu gradientu (10-70% per 60 minučių). Surenkamos frakcijos, kuriose yra EPO (~40 µg EPO, bendras baltymas - 120 µg), ir liofilizuojama. Liofilizuotas EPO
5 ištirpinamas 0.1 M Tris-HCl su 0.15 M NaCl esant pH 7.5 dar kartą gryninamas atvirkštinės fazės HPLC. Frakcijos, kuriose yra EPO, surenkamos ir analizuojamos NDS poliakrilamido gelyje (10%) elektroforezės būdu (Laemmli, U.K., Nature).
10 Surinktose frakcijose yra 15.5 µg EPO, visas baltymas - 25 µg.

Šio išradimo aprašymas pateiktas su detalėmis, pateikti labiau tinkami pavyzdžiai. Autoriai būtų dėkingi, jei
15 specialistai, įvesdami patobulinimus ir modifikacijas, atsižvelgdami čia pateiktas specifikacijas ir piešinius, nenukryptų nuo šio išradimo idėjos ir neišeitų už jo rėmų, kurie pateikti pridedamoje išradimo apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Žmogaus kDNR klonų, ekspresuojančio biologiškai aktyvų eritropoetiną, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad susideda iš tokių stadijų:

(a) išgrynintą eritropoetiną skaldo tripsinu;

(b) sudaro oligonukleotidų zondu rinkinį, remiantis triptinių fragmentų, gautų stadijoje (a), amino rūgščių seka;

(c) atlieka žmogaus genomines DNR bibliotekos skryningą su oligonukleotidų zondais iš stadijos (b);

(d) atrenka klonus, kurie hibridizuojasi su zondais, ir nustato šių klonų seką, siekiant nustatyti, ar jie yra eritropoetino klonai;

(e) identifikuoja eritropoetino kloną iš stadijos (d);

(f) kloną iš stadijos (e) panaudoja kDNR bibliotekos, paruoštos iš žmogaus gemalo kepenų, skryningui;

(g) atrenka eritropoetino kloną iš gemalo kepenų kDNR bibliotekos stadijoje (f).

2. Eritropoetino gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro auginimas tinkamoje terpėje šeimininko ląstelių, turinčių iš esmės tokią pačią DNR seką, kaip parodyta 3 lentelėje, operatyviai sujungtą su ekspresiją kontroliuojančia seka; ir taip pagamintą eritropoetiną atskiria nuo ląstelių ir terpės, o 3 lentelė įeina į šio apibrėžties punkto apimtį.

3. Eritropoetino gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro auginimas tinkamoje terpėje eukariotinių šeimininko ląstelių, turinčių iš esmės tokią pačią DNR seką, kaip parodyta 4 lentelėje, operatyviai sujungtą su ekspresiją kontroliuojančia seka; ir taip pagamintą eritropoetinę atskiria nuo ląstelių ir terpės, o 4 lentelė įeina į šio apibrėžties punkto apimtį.

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šeimininko ląstelės yra žinduolių ląstelės.

5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žinduolių ląstelės yra 3T3 ląstelės.

6. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žinduolių ląstelės yra kuniškojo žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelės.

7. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka yra vektoriuje, kuri be to dar turi jaučio papilomos viruso DNR.

8. Farmacinė kompozicija su farmaciniu požiūriu tinkamu užpildu, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jos sudėtį įeina terapiškai efektyvus eritropoetino kiekis, pagamintas pagal būdą, išdėstytą 2-7 punktuose.

9. Rekombinantinis DNR plazmidės vektorius, turintis kDNR kloną, λ -HEPOFLI3.

10. Mikroorganizmas arba ląstelių linija, transformuoti vektoriumi, aprašytu 9 punkte.

11. Mikroorganizmas arba ląstelių linija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad pasirinkti iš E. coli, mielių, žinduolių arba vabzdžių ląstelių.

12. Mikroorganizmas arba ląstelių linija pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad minėtos ląstelės yra 3T3, C127 arba CHO ląstelės.

13. Biologiškai aktyvus žmogaus eritropoetinas, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad pagamintas auginant kontroliuojamose sąlygose in vitro mikroorganizmus arba ląstelių liniją pagal 11 punktą.

14. Rekombinantinis DNR vektorius, į kurio sudėtį įeina genominis DNR klonas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi nukleotidų seką, kuri pateikta 4 lentelėje, o 4 lentelė įeina į šio apibrėžties punkto apimtį.

15. Žinduolių ląstelių linija, transformuota vektoriumi pagal 14 punktą.

16. Ląstelių linija pagal 15 punktą, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad minėtos žinduolių ląstelės yra CHO ląstelės.

17. Biologiškai aktyvus žmogaus eritropoetinas, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad pagamintas auginant kontroliuojamose sąlygose in vitro ląstelių liniją pagal 15 punktą.

18. kDNR seka, kurios sudėtyje yra DNR seka, apimanti seką nuo 1 iki 166 amino rūgšties, kaip parodyta 3 lentelėje, o 3 lentelė įeina į šio apibrėžties punkto apimtį.

19. kDNR seka pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos sudėtyje yra DNR seka, koduojanti lyderinę amino rūgščių seką Met GlyLeu Gly, parodytą 3 lentelėje, o 3 lentelė įeina į šio apibrėžties punkto apimtį.

20. Rekombinantinis DNR vektorius, kurio sudėtyje yra heterologinis promotorius ir kDNR seka pagal 18 arba 19 punktą.

21. Mikroorganizmas arba ląstelių linija, transformuoti vektoriumi pagal 20 punktą.

22. Mikroorganizmas arba ląstelių linija pagal 21 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad pasirinkti iš E. coli, mielių, žinduolių arba vabzdžių ląstelių.

23. Mikroorganizmas arba ląstelių linija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad minėtos ląstelės yra 3T3, C127 arba CHO ląstelės.

24. Žinduolių ląstelė, kurios sudėtyje yra jaučio papilomos viruso DNR ir DNR seka, koduojanti eritropoetinę (EPO).

25. Ląstelė pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta ląstelė yra C127 arba 3T3 ląstelė.

26. Ląstelė pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtą eritropoetinę (EPO) DNR per transkripciją kontroliuoja pelės metalotioneino promotorius.

27. Ląstelė pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi savo sudėtyje DNR iš pdBPV-MMTneo (342-12).

28. Eritropoetinas, gaminamas pagal būdą, nurodytą 3 arba 4 punkte, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas yra didesnis nei maždaug 200 000 VV/mg baltymo.

29. Eritropoetinas, pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas yra didesnis nei maždaug 275 000 VV/mg baltymo.

30. Eritropoetinas, gaminamas pagal būdą, nurodytą 3 arba 4 punkte, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas yra maždaug 275 000 - 300 000 VV/mg baltymo.

31. Eritropoetinas, pagal 28, 29 arba 30 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra O-glikozilintas.

32. Būdas pagal 2 arba 3 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad kultūrinėje terpėje yra fetalinio serumo.

33. Būdas pagal 32 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šeimininko ląstelės yra žinduolių ląstelės.

34. Būdas pagal 33 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žinduolių šeimininko ląstelės yra COS, CHO, C127 arba 3T3 ląstelės.

35. Biologiškai aktyvus eritropoetinas, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad jis gaminamas pagal 32-34 punktus.

SUAUGUSIO KEPENYS
GEMALO KEPENYS

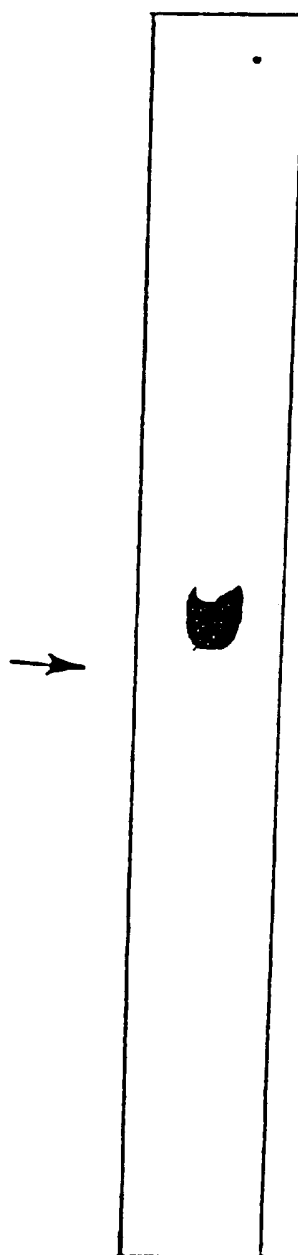


FIG. 1

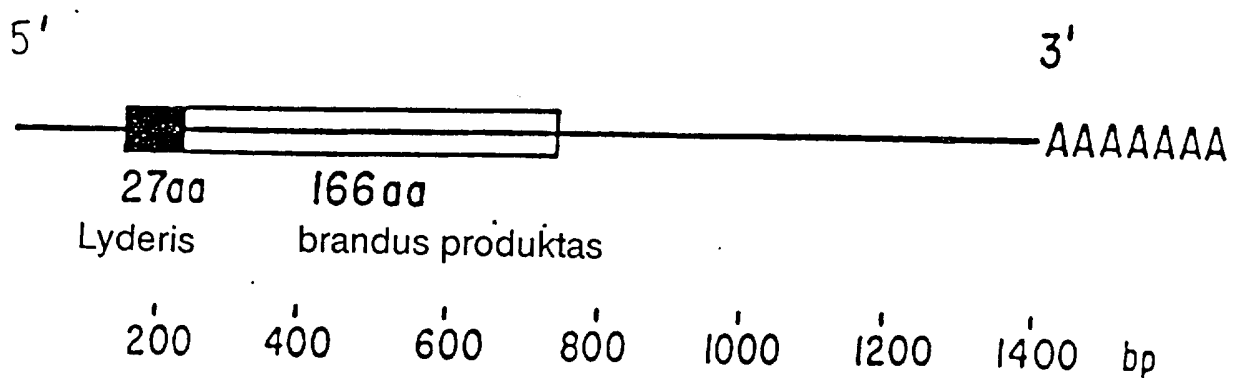
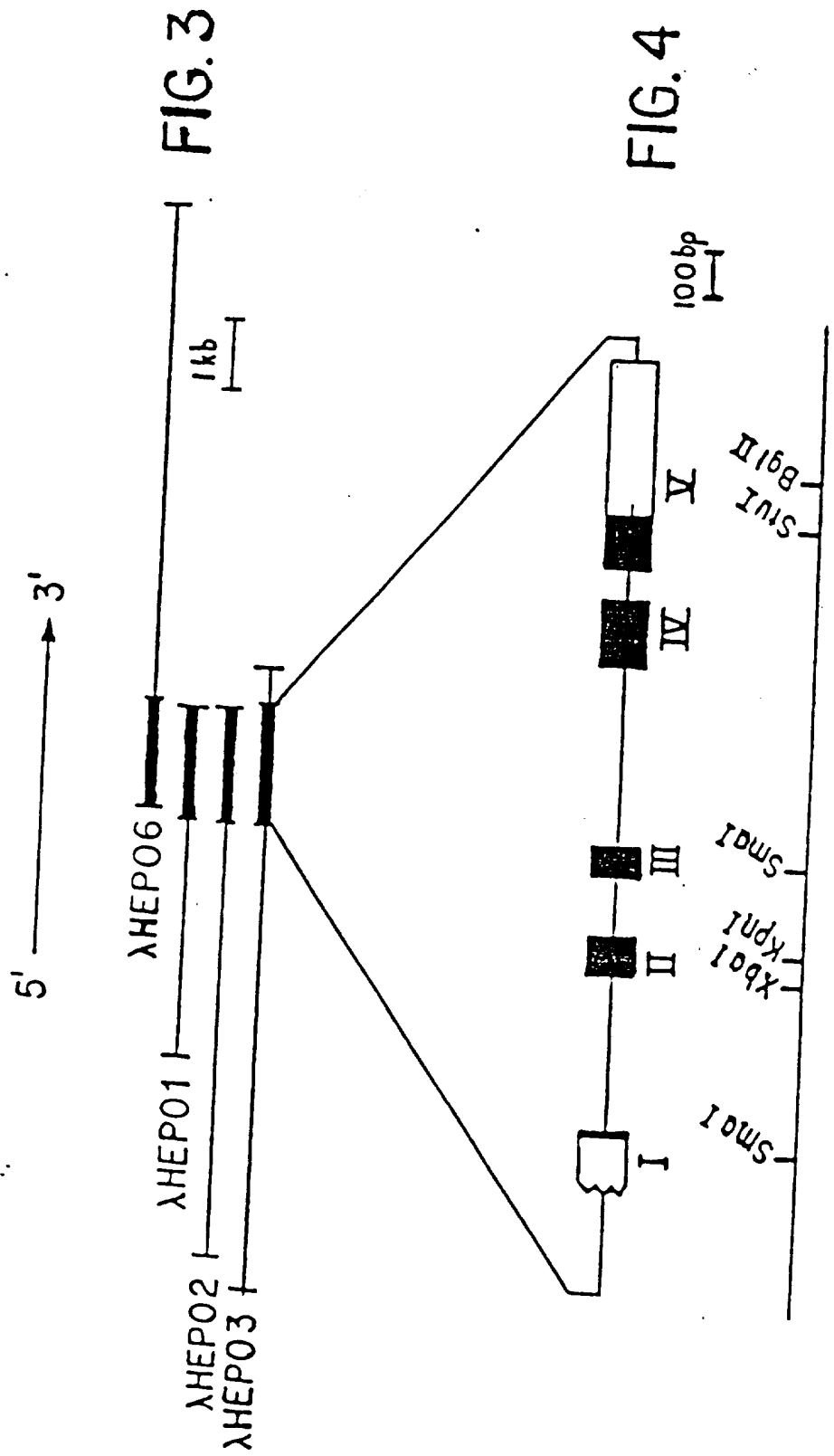


FIG. 2



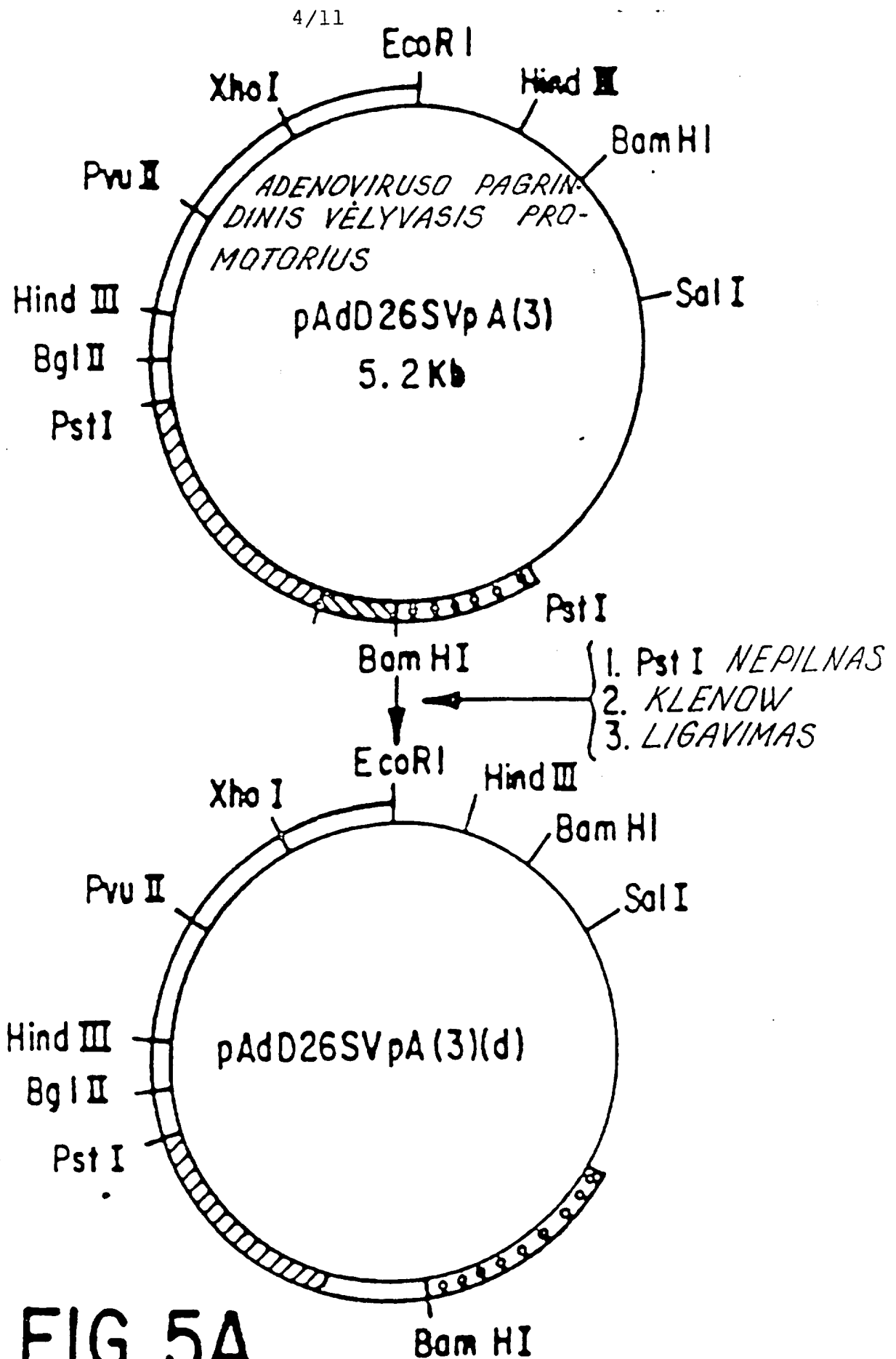


FIG. 5A

5/11

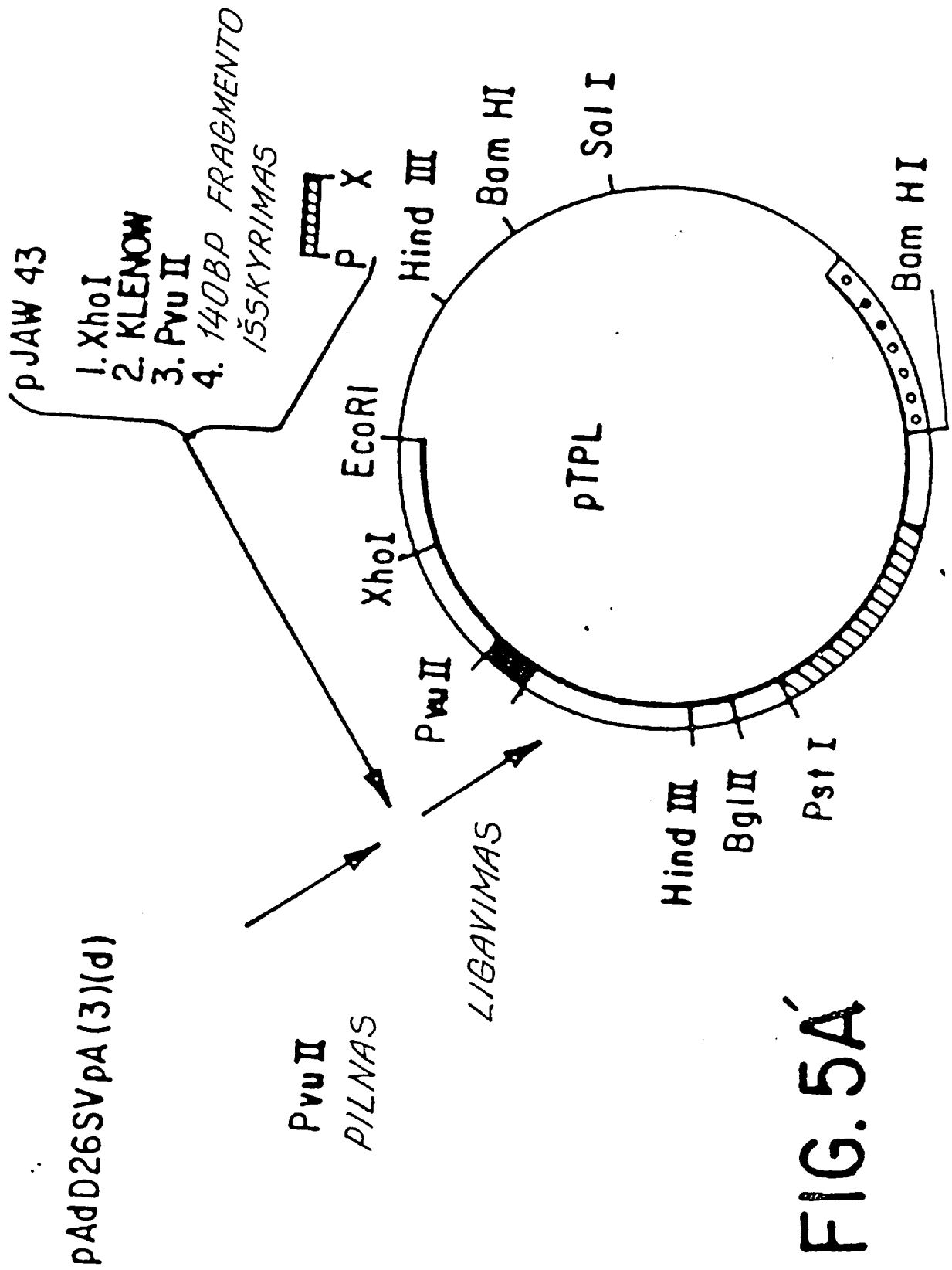


FIG. 5A'

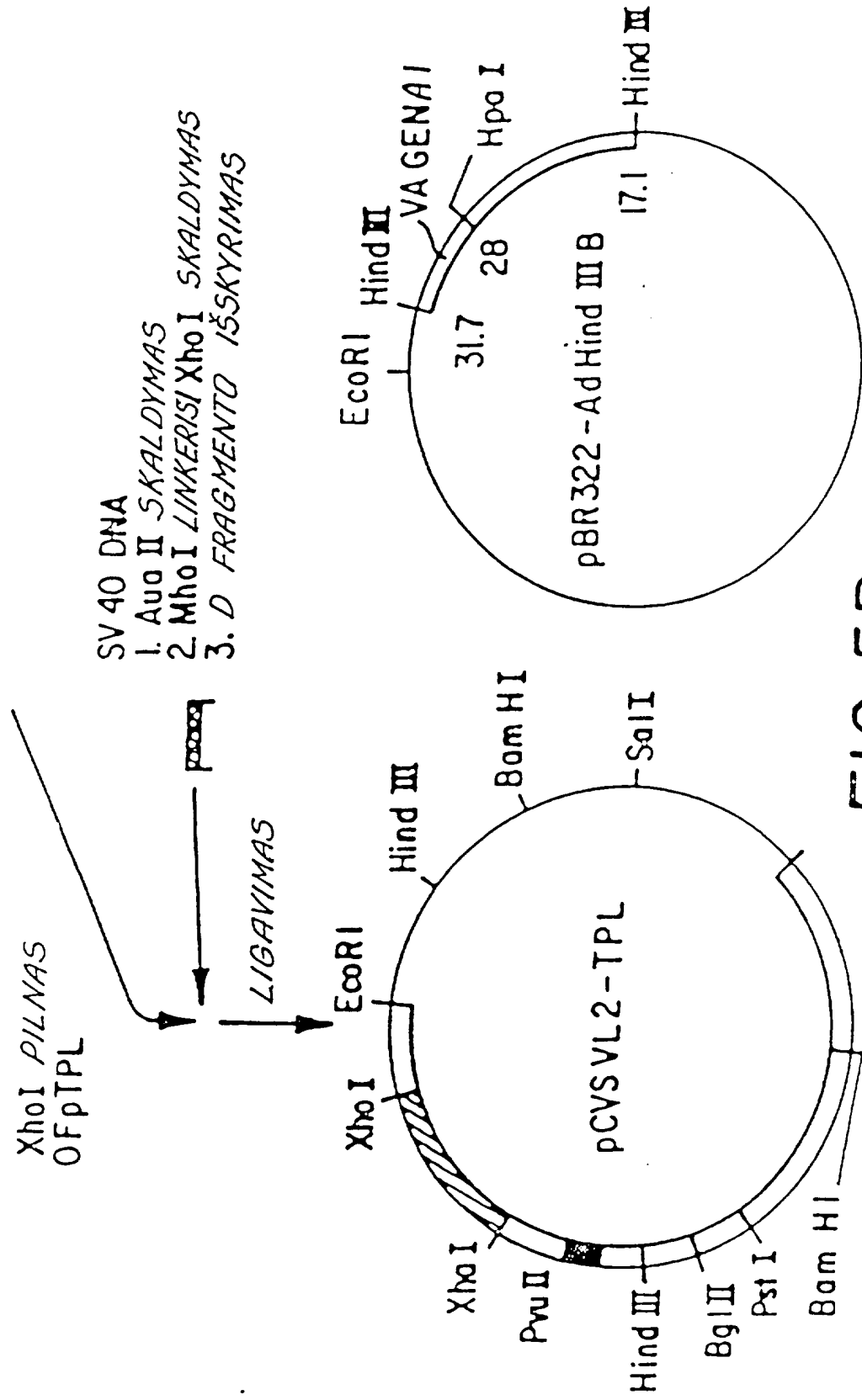


FIG. 5B

7/11

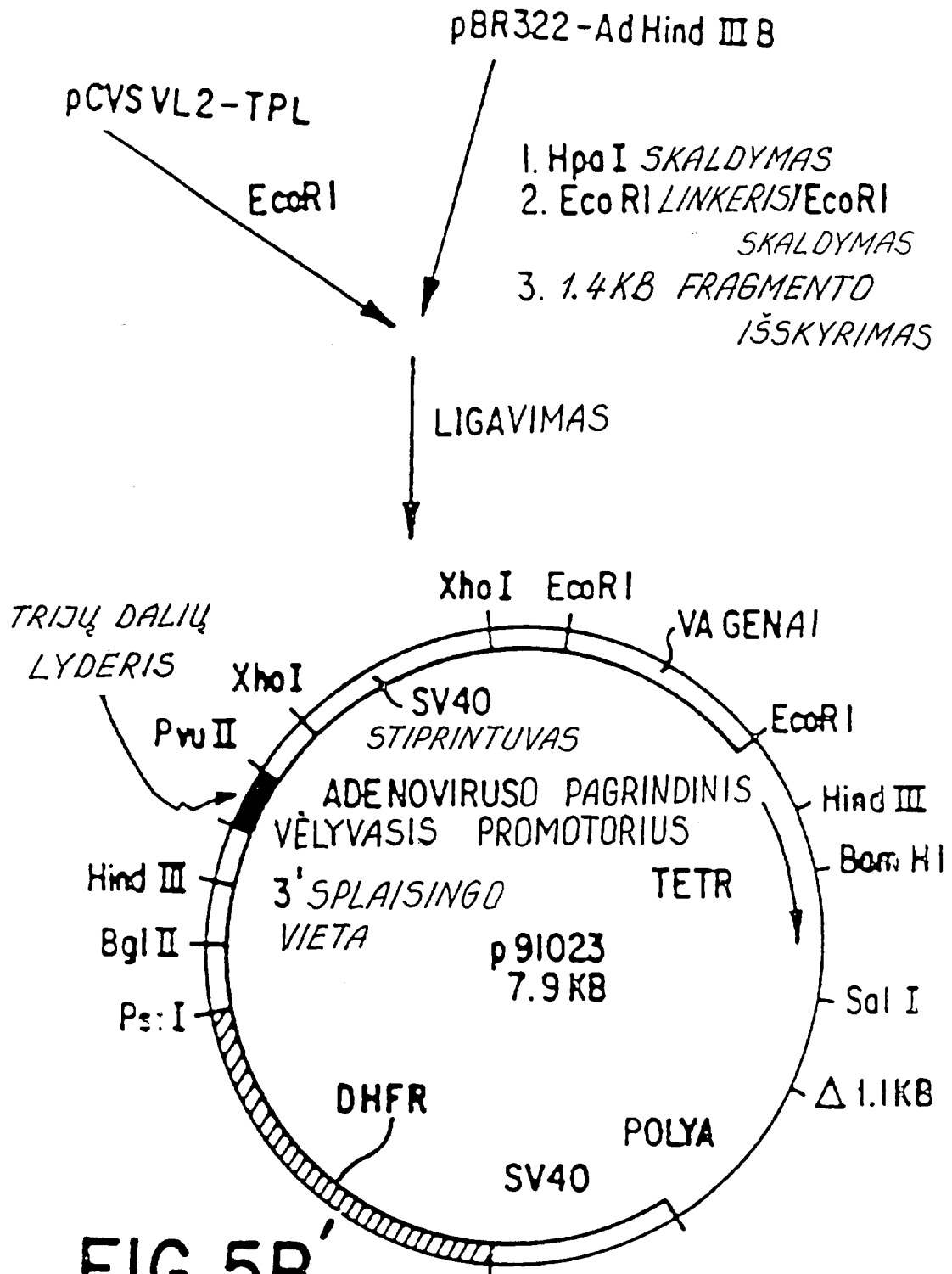


FIG. 5B

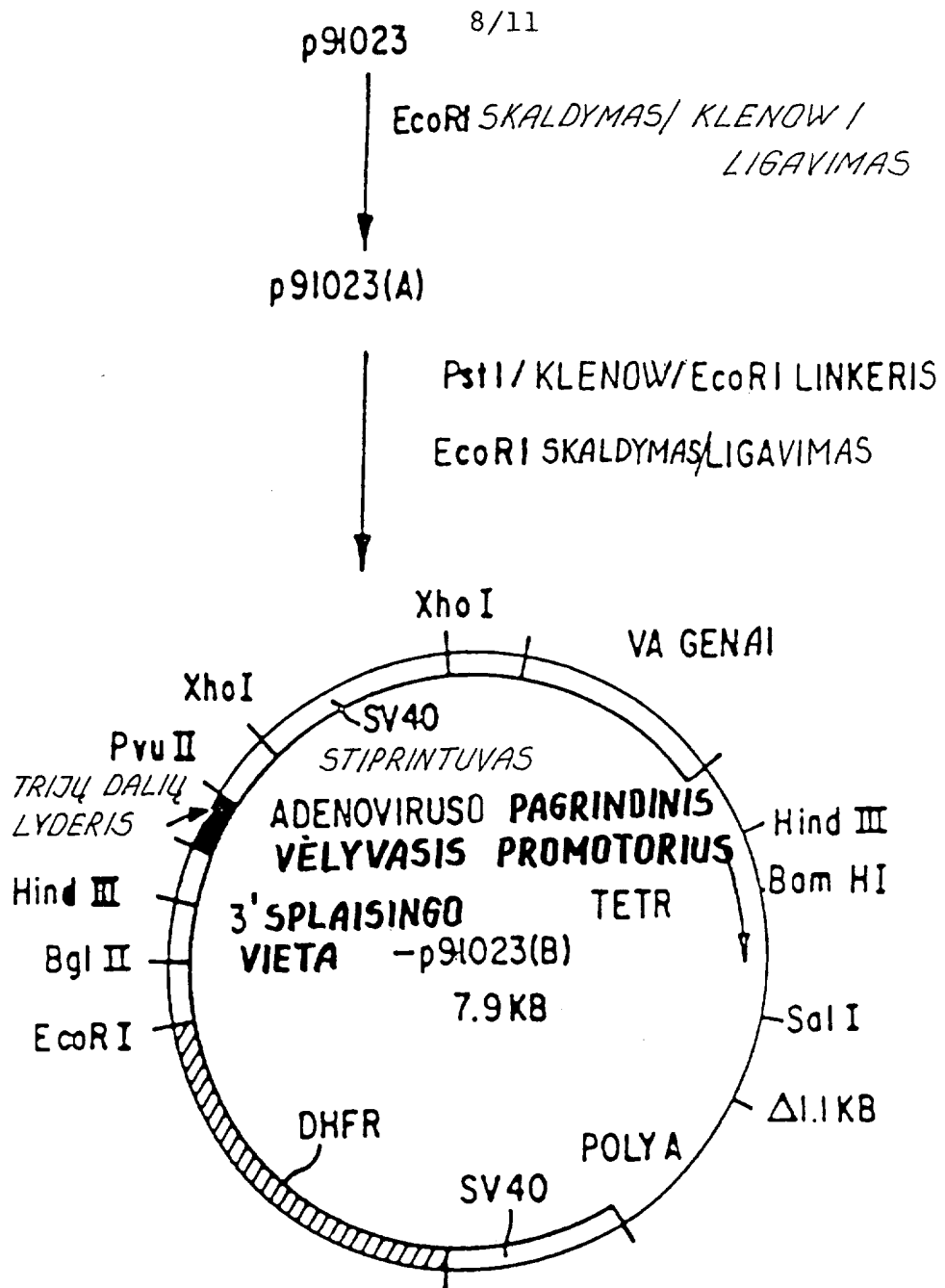


FIG. 5C

9/11

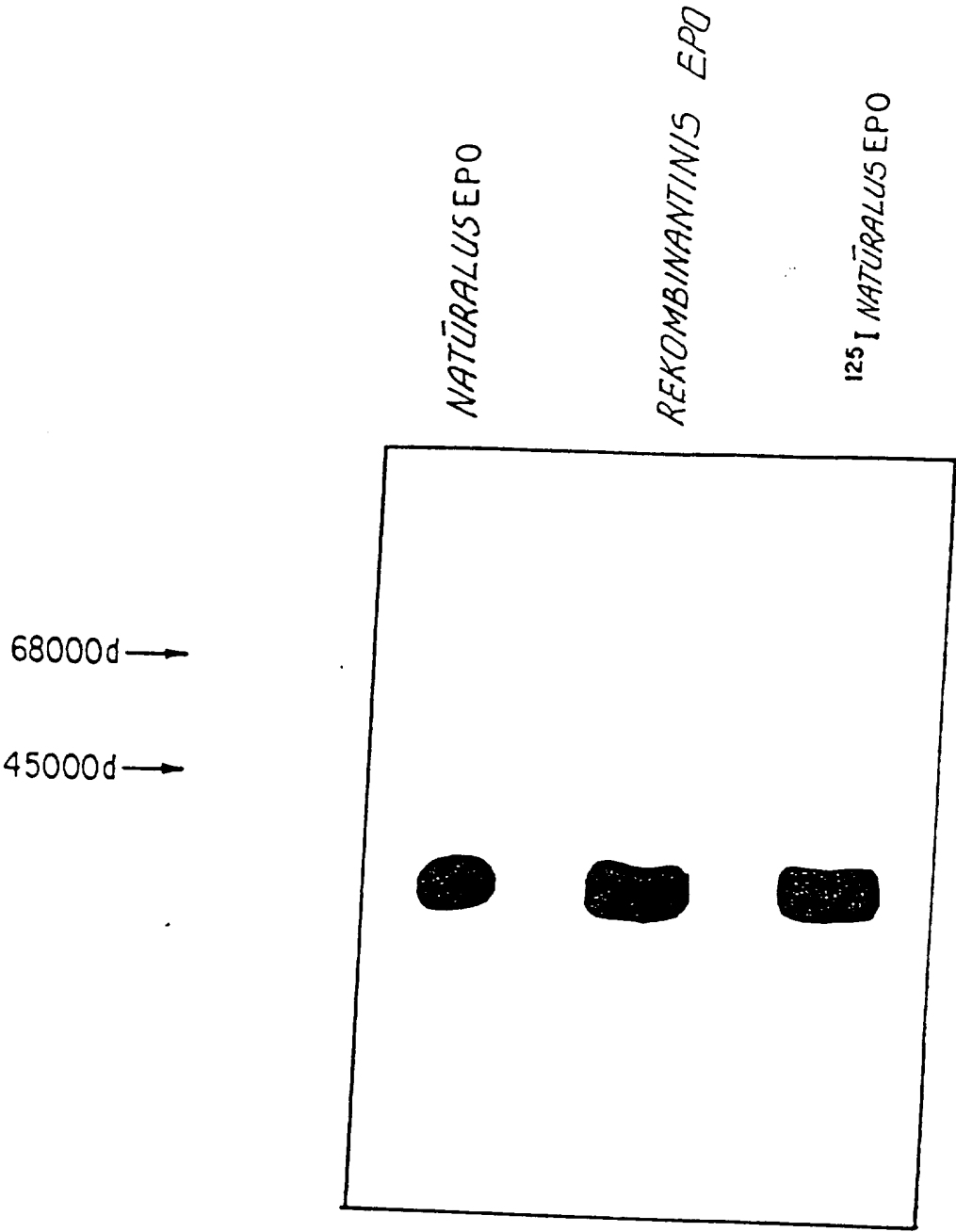


FIG. 6

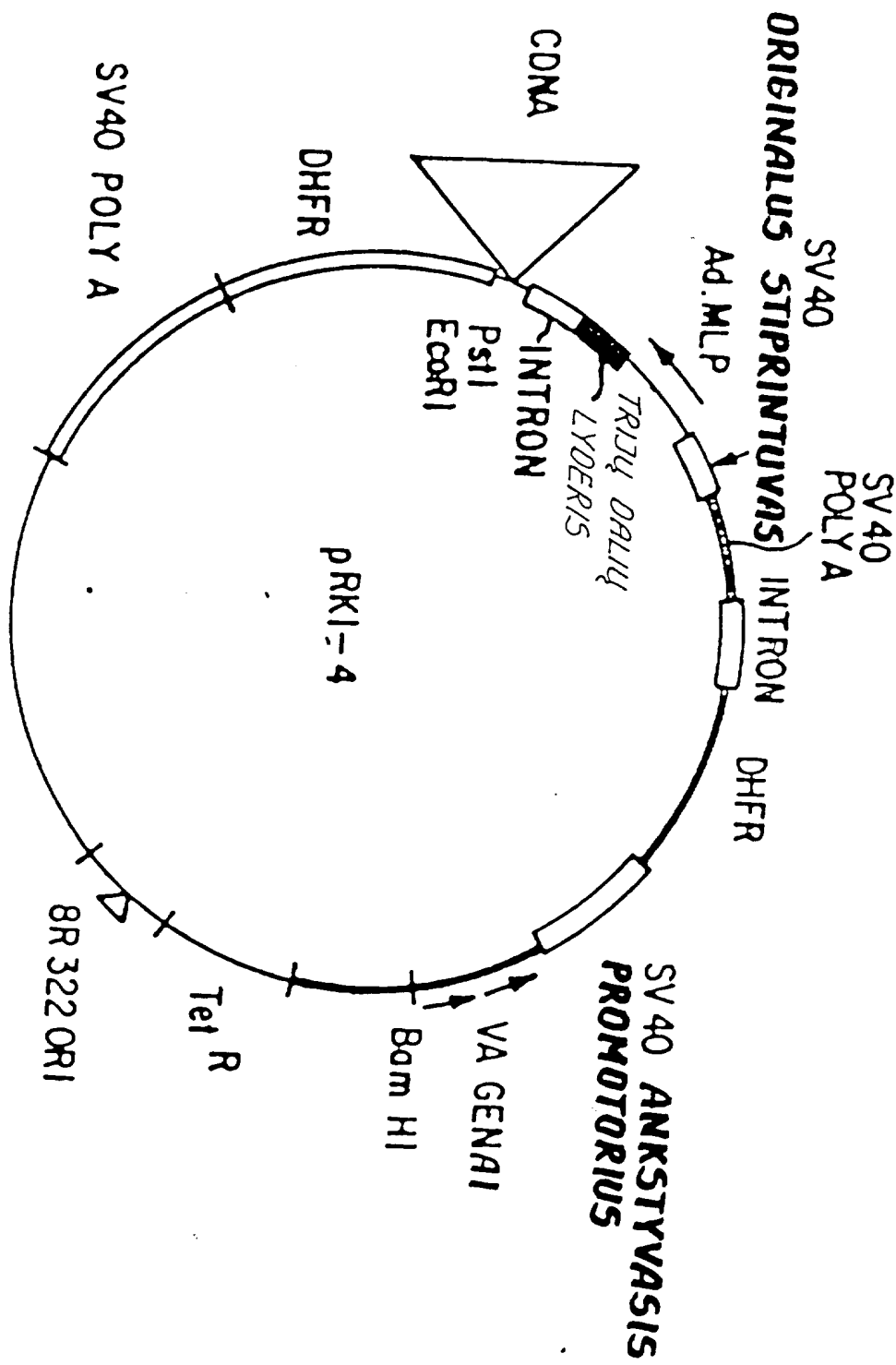


FIG. 7

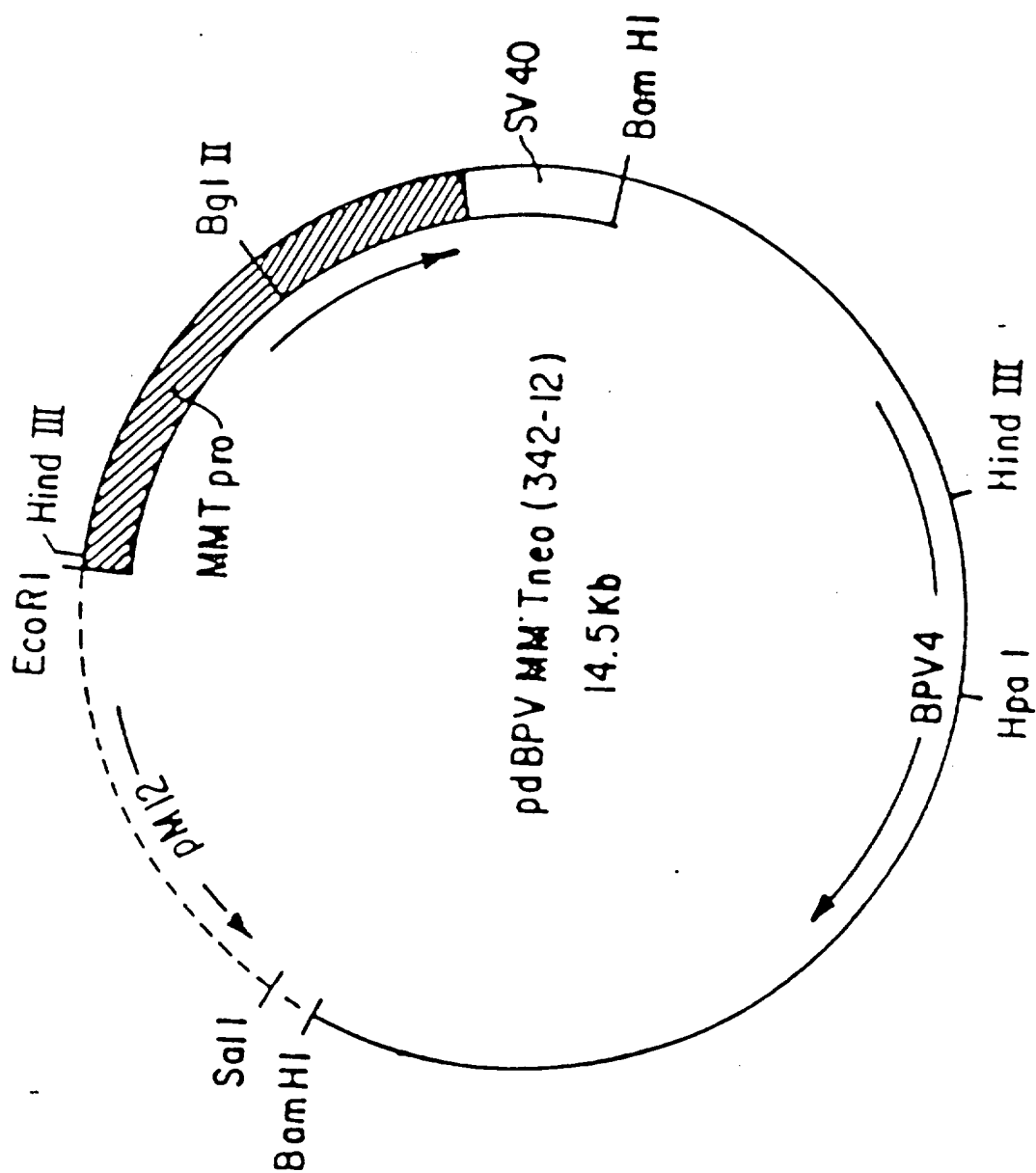


FIG. 8