

(19)



(10) **LT 4012 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4012**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 7/00**
C07K 15/28

(21) Paraiškos numeris: **IP1836**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 31**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 08 26**

(60) SU duomenys: **SU 3917560, 1985 06 19**

(31, 32, 33) Prioritetas: **655841, 1984 09 28, US**
675298, 1984 11 30, US

(72) Išradėjas:

Fu-Kuen Lin, US

(73) Patento savininkas:

Kirin-Amgen, Inc., 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, California
91320, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Poliipeptidų gavimo būdas

(57) Referatas:

Aprašyti nauji polipeptidai, dalinai arba pilnai pasižymintys žinduolių eritropoetino (EPO) pirmine struktūrine konformacija bei viena arba daugiau biologinių savybių, ir kurie pageidaujama forma skiriasi tuo, kad yra egzogeninės DNR sekos ekspresijos prokariotiniame arba eukariotiniame šeimininke produktas. Genominės DNR, kDNR ir sukonstruotos DNR sekos, koduojančios dalinai arba pilnai EPO arba jo analogų aminorūgščių liekanų seką, iliustracijai įvestos į savireplikuojančias plazmides arba virusinius vektorius, naudojamus tinkamų prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelių transformavimui arba transfekavimui, kaip antai bakterijų, mielių ar žinduolių ląstelės kultūroje. Išskiriant iš kultūrinių terpių, ląstelių lizatų arba fragmentų, DNR sekų ekspresijos produktai pasižymi, pavyzdžiui, žmogaus ir beždžionės EPO imuninėmis savybėmis ir biologiniu aktyvumu *in vitro* ir *in vivo*. Atskleisti chemiškai sintetinti polipeptidai, turintys EPO biologines ir imunines savybes. Taip pat atskleisti patobulinti specifinių vienasidžių polinukleotidų heterogeniniame ląsteliniame arba virusiniame pavyzdyje, gautame, pavyzdžiui, iš plazmidėje esančios DNR, arba iš virusų nešančios kDNR, arba iš genominės DNR "bibliotekos", nustatymo būdai.

Šis išradimas priskiriamas manipuliacijai genetinėmis medžiagomis ir, dalinai, rekombinantinėm metodikom, įgalinančiom gauti polipeptidus, pilnai ar dalinai pasižyminčius pirmine struktūrine konformacija ir/arba viena ar daugiau laisvai sutinkamo eritropoetino biologinių savybių.

A. Manipuliacija genetinėmis medžiagomis

Plačiaja prasme genetines medžiagas galima apibrėžti kaip chemines medžiagas, kurios programuoja ir valdo ląstelių bei virusų komponentų gamybą ir apsprendžia ląstelių bei virusų atsakus. Ilgos grandinės polimerinis junginys, žinomas kaip dezoksiribonukleininė rūgštis (DNR), turi savyje visų gyvų ląstelių ir virusų genetinę medžiagą, išskyrus kai kuriuos virusus, programuojamus ribonukleinine rūgštimi (RNR). Struktūrinėmis grandimis DNR-polimeruose yra keturi skirtingi nukleotidai, kurių kiekvienas sudarytas arba iš purino (adeninas ir guaninas), arba iš pirimidino (timinas ir citozinas), surištų su dezoksiriboze-cukrumi, prie kurio prijungta fosfatinė grupė. Nukleotidų prisijungimas linijinio polimero pavidalu vyksta susijungiant vieno nukleotido 5'-fosfatui su kito nukleotido 3'-hidroksilo grupe. Funkcionalinė DNR sutinkama stabilų dvivisiūlių sanplakų, sudarytų iš atskirų nukleotidų siūlų (žinomų kaip dezoksiligonukleotidai) pavidalu, kurių sanplakos susidaro vandenilinės jungties tarp purininių ir pirimidininių bazių dėka, t.y. "komplementarinės" sanplakos, egzistuojančios arba tarp adenino (A) ir timino (T), arba tarp guanino (G) ir citozino (C). Nukleotidus priimta vadinti pagal juos sudarančių purininių arba pirimidininių bazių pavadinimus, o nukleotidų komplementarines sanplakas dvivisiūlėje DNR (t.y. A-T ir G-C) minėti kaip "azotinių bazių poras". Ribonukleininė rūgštis yra polinukleotidas, turintis dažniau adeniną, guaniną, citoziną ir uracilą (U), nei timiną, surištą su riboze arba fosfatine grupe.

Trumpiau kalbant, DNR programuojanti funkcija dažniausiai realizuojama procesu, kurio metu DNR nukleotidų specifinės sekos (genai) "transkribuojasi" į santykinai nestabilius informacinės RNR (iRNR) polimerus. Savo ruožtu iRNR tampa struktūrinių, reguliatorinių ir katalitinių baltymų susidarymo iš aminorūgščių matrica. Šis iRNR "transliacijos" procesas apima smulkių RNR siūlų (tRNR) funkcionavimą, kurie transportuoja ir išlygina individualias aminorūgštis išilgai iRNR siūlų, leisdami reikiama aminorūgščių seka susidaryti nukleotidams. iRNR "informacija", gaunama iš DNR ir sukuria galimybę tRNR padavimui bei bet kurios iš dvidešimties amino

rūgščių orientacijai polipeptido "ekspresijai", yra tripletinių "kodonų" (trijų nukleotidinių bazių tam tikro eiliškumo grupuočių) pavidale. Tam tikra prasme baltymo susidarymas yra galutinė genetinė informacija (apsprendžiama geno nukleotidiniu eiliškumu) programuojama "ekspresijos" forma.

DNR "promotorinės" sekos paprastai atsiranda anksčiau nei genas DNR-polimere ir paruošia vietą transkripcijos į RNR inicijavimui. DNR "regulatorinės" sekos taip pat dažniau yra "aukščiau prieš tėkmę" (t.y. anksčiau) nei genas šiame DNR-polimere, suriša baltymus, apsprendžiančius transkripcinio inicijavimo dažnį (arba greitį). Kolektyviai įvardijamos "promotorine/regulatorine" arba "valdančiąja" DNR seka, šios anksčiau nei konkretus genas (ar genų grupės) atsirandančios funkcionaliniame DNR-polimere sekos apsprendžia ar įvyks transkripcija ir, galų gale, geno ekspresija. DNR sekos, "lydinčios" geną DNR-polimere ir užtikrinančios komandą baigti transkripciją į iRNR, įvardijamos kaip transkribavimo "terminatorinės" sekos.

Paskutinio dešimtmečio mikrobiologinės technologijos dėmesio centre yra bandymai pagaminti industrijai bei farmacijai svarbias medžiagas, panaudojant mikroorganizmus, kurie arba neturi iš anksto genetiškai koduotos informacijos, skirtos įterptam į jų DNR pageidaujamam produktui, arba (žinduolių ląstelėms kultūroje) įprastu keliu neišreiškia pastebimame lygmenyje chromosominio geno. Paprasčiau kalbant, genas, apsprendžiantis pageidaujamo polipeptidinio produkto struktūrą yra arba izoliuotas nuo donorinio mikroorganizmo, arba chemiškai susintetintas ir stabiliai introdukuotas į kitą mikroorganizmą (geriausiai save reguliuojantį vienaląstį mikroorganizmą), kaip antai bakterijas, mieles arba žinduolių ląsteles kultūroje. Egzistuojanti genų ekspresijos į "transformuotas" ar "transfektuotas" šeimininko mikrobines ląsteles įranga, kurdama pageidaujamą produktą dirba panaudodama ekzogeninę DNR kaip iRNR transkripcijos matricą, kuri po to pertransliuojama į nesibaigiančią amino rūgščių liekanų seką.

Ši technikos sritis dažnai sutinkama patentinėse ir literatūrinėse publikacijose, susijusiose su "rekombinantinės RNR" metodikomis, skirtomis genetinių medžiagų (naudojamų

atrinktų šeimininko mikroorganizmų transformacijai) išskyrimui, sintezei, valymui bei amplifikacijai. JAV patentas Nr. 4237224, išduotas Cohen et al., pavyzdžiui, skirtas vienaląsčių šeimininko mikroorganizmų su "hibridine" virusine ar žiedine plazmidine DNR transformacijai, apjungiančiai rinktines ekzogenines DNR sekas. Cohen et al. patento metodikose pirmą kartą panaudota transformacijos vektoriaus gamyba, besiremianti fermentiškai atskeliamos virusinės arba žiedinės plazmidinės DNR, reikalingos linijinės DNR siūlams formuoti. Atrinkti svetimi ("egzogeniniai" arba "heterologiniai") DNR siūlai, paprastai turintys pageidaujamą produktą koduojančias sekas, gaunami linijiniame pavidale panaudojus panašius fermentus. Tiesinė virusinė arba plazmidinė DNR auginama su svetimą DNR dalyvaujant "susiuvantiems" fermentams, sugebantiems realizuoti atstatymo procesą, o "hibridiniai" vektoriai susidaro turėdami atrinktą ekzogeninės DNR segmentą, "supintą" į virusinės ar žiedinės DNR plazmidę.

Suderinamų šeimininko vienaląsčių mikroorganizmų transformacija hibridiniu vektoriumi baigiasi daugkartiniu ekzogeninės DNR kopijų šeimininko ląstelių populiacijoje susidarymu. Kai kuriais atvejais pageidaujamu rezultatu yra tiesiog svetimos DNR amplifikacija, o išaugintu "produktu" yra DNR. Dažniau transformacijos tikslu yra ekspresija, realizuojama šeimininko ląstelių ekzogeninės DNR, kaip plataus masto pramonei svarbių baltymo fragmentų arba polipeptido, koduojamų svetimos DNR, sintezė. Žiūrėti, taip pat, pavyzdžiui JAV patentus: Nr.4264731 (išduotas Shine), Nr.4273875 (išduotas Manis), Nr.4293652 (išduotas Cohen), bei Europos patentinę paraišką Nr.093619, publikuotą 1983 metų spalio 9d.

Specifinių DNR sekų išvystymas iki supynimo į DNR vektorius pasiekiamas panaudojant eilę techninių priemonių, žymia dalimi priklausančių nuo donoro "svetimumo" projektuojamam šeimininkui laipsnio, bei nuo šeimininko formuojamo polipeptido dydžio. Bijant pernelyg didelio supaprastinimo, galima tvirtinti, jog egzistuoja trys pagrindiniai alternatyvūs būdai: 1) dvisiulės DNR sekos "išskyrimas" nuo donoro genominės DNR; 2) DNR sekos, sukuriančios dominančio polipeptido kodą, cheminė sintezė; 3) dvisiulės DNR sekos sintezė in vitro, naudojantis iRNR,

išskirtos iš donoro ląstelių, fermentine "atvirkštine transkripcija". Minėti būdai, kuriuose naudojamas DNR-iRNR "komplemento" susidarymas, paprastai įvardijami kaip "kDNR"-būdai.

DNR sekų gavimas dažnai yra pasirinkimo metodu, kuomet žinoma pilna pageidaujamo polipeptido aminorūgščių liekanų seka. DNR gavimo metodikos aprašytos lygiagrečiai peržiūrimoje paraiškoje JAV patentui Nr.483451 (paduotoje 1983m. balandžio 15d. ir, atitinkamai, paraiškoje PCT US 83/0085, publikuotoje 1983m. lapkričio 24d. numeriu W083/04053), pavyzdžiui, sukuria priemonės tokių ypatingai laukiamų rezultatų pasiekimui, kaip: 1) numatymas besikaitaliojančių kodonų, paprastai stebimų šeimininko mikroorganizme, atrinktame ekspresijai (pvz., "geriausių" kodonų numatymas mielėse arba E.Coli); 2) netransliuojamų "introninių" sekų išvengimas (paprastai sutinkamų žinduolių genominėse DNR sekose, bei jų RNR matricose), kurios yra be vargo apdorojamos šeimininko ląstelių; 3) nepageidaujamų polipeptidinių sekų išvengimas (paprastai koduojamų genominėmis DNR ir kDNRsekomis tačiau dažnai sunkiai atskiriamomis, naudojant bakterines ar mielines šeimininko ląsteles, nuo dominančio polipeptido); 4) numatymas lengvo DNR "įmontavimo" į tinkamus ekspresyvinis vektorius samplakose su pageidaujamomis promotorinėmis/reguliatorinėmis ir terminatorinėmis sekomis; 5) numatymas lengvo genų "sumontavimo", kurie koduotų polipeptidinius fragmentus bei pageidaujamų polipeptidų analogus.

Kuomet pilna pageidaujamo polipeptido aminorūgščių liekanų seka nėra žinoma, betarpiškas DNR sekų gavimas yra neįmanomas. DNR sekų, koduojančių polipeptidus kDNR metodu, izoliavimas tampa parinkimo metodu, nežiūrint į galimus ekspresijos vektorių (sugebančių užtikrinti aukštą, kaip minėta anksčiau, mikrobinio ekspresyvumo lygį) montavimo sunkumus. Tarp standartinių kDNR sekų izoliavimo metodikų yra plazmidinių kDNR-"bibliotekų", atsirandančių dėka atbulinės kDNR transkripcijos, dažnai sutinkamos donoro ląstelėse, atrinktose atsakingomis už genų aukšto lygio ekspresiją (pvz. kDNR bibliotekos, atsiradusios iš ląstelių, išskiriančių santykinai didelius augimo hormonų produktų kiekius). Kuomet žinomos didelės polipeptidų amino rūgščių sekos dalys, tuomet žymėtas, zondines vienas iš DNR sekas, dubliuojančias seką,

spėjamai esančią "planinėje" kDNR, galima panaudoti metodikose, aprašytose JAV patente Nr.439443, išduotame Weissman et al. Ilgų oligonukleotidinės hibridizacijos zondų panaudojimas aptariamas šiuose darbuose: Wallace et al., Nucl. Acids Res., 6, p.3543-3557(1979), Reyes et al. P.N.A.S. (USA), 79, p.3270-3274(1982) ir Iaye et al., Nucl. Acids Res., 11, p.2325-2335(1983). Taip pat žiūrėkite JAV patentą Nr.435835, išduotą Falkow et al. ir aprašantį DNR/DNR-hibridizacijų (diagnostikos metu) metodikas; publikuotas Europos patentines paraiškas Nr.0070685 ir Nr.0070687, priskirtinas šviesą skleidžiančiom žymėm vienasialiuose polinukleotidiniuose zonuose; darbą: Davis et al. "Manual for Genetic Engineering advanced Bacteriae Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p.55-58 ir p.174-176(1980), skirtą hibridizacijos metodikoms bei epideminiam susirgimams ir New England Nuclear (Boston, Mass), "Genc. Screen" Hybridization Transfer membrane materials.

Vienas svarbiausių nesenų pasiekimų metodikose, skirtose rekombinantinių klonų ekranavimo hibridizacijai, yra žymėtų mišrių oligonukleotidinių zondų panaudojimas, kurių kiekvienas potencialiai yra specifinės DNR sekos, apimančios heterogeninį vienasialių DNR ir RNR mišinį, pilnu komplementu. Šios metodikos pripažintos ypatingai naudingomis išaiškinant kDNR-klonus, gautus iš šaltinių, sukuriančių labai mažus dominančio polipeptido iRNR sekų kiekius. Trumpiau kalbant, griežtų hibridizacijos sąlygų naudojimas (siekiant išvengti nespecifinių sujungimų), kartais įgalina specifinio klonoautoradiografinę vizualizaciją kDNR hibridizacijos pabaigoje tam vieninteliam mišinio zondui, kuris yra jos pilnu komplementu. Daugiausiai žiūrėkite: Wallace et al., Nuc. Acids, Res., 9, p.879-897(1981); Suggs et al., P.N.A.S. (USA), 78, p.6613-6617(1981); Choo et al., Nature, 299, p. 178-180(1982); Kurachi et al., P.N.A.S. (USA), 79, p.6461-6464(1982); Ohkubo et al., P.N.A.S. (USA), 80, p.2196-2200 (1983); Kornblihtt et al., P.N.A.S. (USA), 80, p.3218-3222(1983).

Aplamai, darbo: Wallace et al.(1981) mišrių zondų metodikos įvairių autorių buvo išplėstos iki momento, kuomet buvo pranešama apie gautus patikimus rezultatus izoliuojant kDNR klonus, panaudojant mišrų 32-narių oligonukleotidinių zondų

pulą, kurių ilgis 16 pagrindų (16-men), tolygiai besikeičiančių DNR sekų kartu su vienetiniu 11-men, skirtų dvipoziciniam "teigiamam" dominančio kDNR patvirtinimui. Žiūrėkite darbą Singer-Sam et al., P.N.A.S. (USA), 80, p.802-806(1983).

Genominės DNR izoliatų panaudojimas iš trijų anksčiau minėtų būdų yra mažiausiai paplitęs specifinių sekų, naudojamų rekombinantinėse metodikose, išvystymui. Tai ypatingai teisinga rekombinantinėm metodikom, skirtom žinduolių polipeptidų mikrobinio ekspresyvumo užtikrinimui, ir daugiausia apsprendžiama žinduolių genominės DNR sudėtingumu. Tuo būdu, nors ir egzistuoja patikimos metodikos žmogaus bei kitų žinduolių genominės DNR vystymui [žiūrėkite, pavyzdžiui, darbą Lown et al., 15, p.1157-1174(1978), skirtą žmogaus genominės bibliotekos (paprastai įvardinamos kaip "Maniatis biblioteka") generavimo metodikoms; darbą Karn et al., P.N.A.S. (USA), 77, p.5172-5176(1980), nagrinėjantį žmogaus genominę biblioteką endonukleazinės fragmentacijos alternatyvaus apribojimo metodu; darbą Blatnes et al., Science, 196, p.161-169(1977), aprašantį jaučio genominės bibliotekos struktūrą], atlikta keletas gana sėkmingų bandymų panaudojant hibridizacijos izoliuotoje genomineje DNR metodikas, nesant perspektyvinio amino rūgščių ar DNR sekų numatymo. Kaip pavyzdį galima pateikti darbą Fiddes et al. J. Mol. and App. Genetics, 1, p.3-18(1981), kuriame pranešama apie sėkmingai izoliuotą geną, koduojantį alfa-subvienetą žmogaus hipofizarinių glikoproteidinių hormonų, panaudojant "maksimaliai ilgą" zondą, apimantį pilną 621 azotinių bazių porų (iš prieš tai alfa-subvienetui izoliuotos kDNR sekos) fragmentą. Kitame darbe Das et al., P.N.A.S. (USA), 80, p.1531-1535(1983) pranešama apie žmogaus genominių klonų izoliavimą HLA-DR žmogui, panaudojant 175 poras azotinių bazių turintį sintetinį oligonukleotidą. Ir, pagaliau, darbe Anderson et al., P.N.A.S. (USA), 80, p.6838-6842(1983) pranešama apie jaučio genomio klonų pankreatino tripsininio inhibitoriaus (BPTI) izoliaciją panaudojant vienetinį zondą, turintį 86 azotinių bazių ilgį bei sumontuotą pagal žinomą BPTI amino rūgščių seką. Autoriai pažymi prastas perspektyvas izoliuojant iRNR, tinkamos kDNR bibliotekos sintezei, nes stebimi akivaizdžiai žemi iRNR lygmenys pirminiai

pasirinktuose šaltiniuose: paausinėje liaukoje ir plaučio audiniuose. Po to išreiškiama viltis, jog pavyks genomines bibliotekos zondavimas panaudojant žymėtų zondų mišinį ir konstatuojama: "Mišrių sekų oligodezoksিনukleotidiniai zondai daugiausiai buvo naudojami nežinomos sekos baltyminių genų išskyrimui iš kDNR bibliotekų. Tokie zondai paprastai yra 8-32 oligonukleotidų mišinys, turintis 14-17 nukleotidų ilgį ir yra kiekvienos imamos nedidelio ilgio (5-6 liekanos) aminorūgščių sekos kodonų kombinacijos tipiškai atstovai. Griežtomis hibridizacijos sąlygomis, kuomet susidaro prasta situacija neteisingai suporuotų azotinių liekanų zondams, šie mišiniai sugeba lokalizuoti genų specifinės sekas nedidelio sudėtingumo klonalinėse bibliotekose. Nežiūrint to, dėl savo menko ilgio bei nevienalytiškumo, mišrūs zondai dažnai netenka specifiškumo, reikalingo zonduojant tokias sudėtingas sekas, kaip žinduolių genomas. Dėl to šis būdas tampa nepraktišku izoliuojant žinduolių baltyminius genus, kuomet atitinkamos iRNR yra nepasiekiamos." (Nuorodų nėra).

Tuo būdu šioje technikos srityje išliko poreikis tobulinti greitos ir efektyvios kDNR klonų izoliacijos metodus ypač tais atvejais, kuomet mažai žinoma apie aminorūgščių sekas bei "išsodrinti" iRNR audinio šaltiniai nelabai pasiekiami kDNR bibliotekų montavimui. Tokie patobulinti metodai būtų ypatingai naudingi, jei galėtų būti panaudojami žinduolių genominių klonų izoliavimui, kuomet informacija apie amino rūgštinės polipeptido (koduojamas ieškomo geno) sekas būtų nepilna.

B. Eritropoetinas, kaip dominantinis polipeptidas

Eritropoezė (raudonųjų kraujo kūnelių gamyba) vyksta visą žmogaus gyvenimą tam, kad kompensuotų suirusias ląsteles. Eritropoezė - tai labai tiksliai reguliuojamas fiziologinis mechanizmas, kuris leidžia kraujyje pasigaminti pakankamam kiekiui raudonųjų kraujo kūnelių, reikalingų teisingai organizmo oksigenacijai, bet ne tokiai didelei, kad ląstelės trukdytų kraujotakai. Raudonųjų kraujo kūnelių gamyba vyksta kaulų čiulpuose kontroliuojant hormonui eritropoetinui.

Eritropoetinas - rūgštus glikoproteidas, kurio molekulinė masė apie 34000 Daltonų, gali būti sutinkamas trijose formose:

, β ir asialo. α ir β formos nežymiai skiriasi angliavandeniniais komponentais, tačiau turi vienodą potenciją, biologinį aktyvumą bei molekulinę masę. Asialo forma - tai α ir β forma be galinio angliavandenio (sialo rūgšties). Kai organizmas yra sveikas ir audiniai gauna pakankamą oksigenaciją iš esančio eritrocitų kiekio, eritropoetino koncentracijos plazmoje yra labai žemos. Ši normaliai žema koncentracija yra pakankama, kad vyktų normali raudonųjų kraujo kūnelių, kurie paprastai žūva oksidacijos procese, kaita.

Eritropoetino kiekis kraujo plazmoje didėja hipoksijos sąlygomis, kai sumažėja kraujotakoje deguonies pernešimas kraujo ląstelėmis. Hipoksija gali būti dėl prarasto didelio kraujo kiekio kraujuojant, yrant raudoniesiems kraujo kūneliams radiacinio spinduliavimo pasėkoje, sumažėjus deguonies gavimui aukštumose ar ilgai užtrukus būklei be sąmonės, o taip pat prie įvairių anemijos formų.

Veikiant hipoksijos poveiktiems audiniams, eritropeptinas padidina raudonųjų kraujo kūnelių gamybą, stimuliuojant pirminių kraujodaros ląstelių vartimą proeritroblastais kaulų čiulpuose, kur palaipsniui subręsta, sintezuoja hemoglobina ir realizuojasi kraujotakoje kaip raudonieji kraujo kūneliai. Kai raudonųjų kraujo kūnelių kiekis kraujyje didesnis, negu būtina, kad aprūpinti audinius deguonimi, eritropoetino kiekis kraujotakoje sumažėja.

Žiūrėkite daugiausia šiuos darbus: Testa et al., Exp. Hematol, 8(Supp.8), 144-152(1980); Tong et al., J. Biol. Chem, 256 (24), 12666-12672(1981); Goldwasser, J. Cell. Physiol, 110(Supp.1), 133-135(1982); Finch, Blood., 60(6), 1241-1246(1982); Sytowski et al., Exp. Hemat., 8(Supp.8), 52-64(1980); Naughton, Cenn, Clin. Lab. Sec, 13(5), 432-438(1983); Weiss et al., Am. J. Vet. Res, 44(10), 1832-1835(1983); Lappin et al., Exp. Hematol, 11(7), 661-666(1983); Murphy et al., Acta Hematologica Japonica 46(7), 1380-1396(1983); Dessypris et al., Brit. J. Haematol, 56, 295-306(1984); ir Enumananael et al., Am. J. Physiol, 247(1 pt 2), 168-76(1984).

Kadangi eritropoetinas yra svarbus susidarant raudoniesiems kraujo kūneliams, hormonas turi potencialiai naudingą panaudojimą kaip diagnostikoje, taip ir gydant kraujo

pakitimus, susijusius su mažu ar nepakankamu raudonųjų kraujo kūnelių kiekiu. Žiūrėkite šiuos darbus: Penathur-Das et al., Blood, 63 (5), 1168-1171 (1984) ir Haddy, Asn. Yuor. Ped. Hematol./Oncol., 4, 191-196 (1982) apie eritropoetinę gydant ligas, o taip pat Eschbach et al., J. Clin. Invest., 74 (2), 434-441 (1984), kur aprašytas terapinis režimas ureminei airai, remiantis reakcija in vivo, į plazmos, praturtintos eritropoetinu, įpylimą, ir pasiūlyta dozė 10 V EPO/kg per dieną, kuri koreguoja tokio tipo, susijusią su lėtiniu inkstų funkcijos nepakankamumu, anemiją 15-40 d. bėgyje. Taip pat žiūrėkite darbus Krane, Henry Ford, Hosp. Med. J., 31 (3), 177-181 (1983). Neseniai buvo nustatyta, kad pakankamų eritropoetino kiekių buvimas vien JAV per metus išgydys nuo anemijos 1600000 žmonių. Žiūrėkite, pvz., Morrison, "Bioprocessing in Space on Overview", psl. 557-571 in the World Biotech. Report 1984, Volume 2: USA, Online Publications, New York, N.Y. (1984). Paskutiniai tyrimai sudarė pagrindą numatytos eritropoetino terapijos efektyvumą hematologinių susirgimų, sutrikimų ir būklių įvairovei: Vedaoto et al., Acta Haematol., 71, 211-213 (1984) (beta-talasemija); Oichinsky et al., J. Pediatr., 105(1), 15-21 (1984) (cistinė fibrozė); Cotes et al., Brit. J. Obstet. Gyneacol., 94(4), 304-311 (1983) (nėštumas, menstruacijų ciklo sutrikimai); Haga et al., Acta Pediatr. Scand., 72, 827-831 (1983) (ankstyvoji neišnešiotumo anemija); Claus-Walker et al., Arch. Phys. Med. Rehabil., 65, 370-374 (1984) (stuburo smegenų pažeidimai); Dunn et al., Eur. J. Appl. Physiol., 52, 178-182 (1984) (kosminis skrydis); Miller et al., Brit. J. Haematol., 52, 545-590 (1982) (ūmus kraujo netekimas); Udupe et al., J. Lab. Clin. Med., 103(4), 574-580 ir 581-588 (1984); Lipschitz et al., Blood, 63(3), 502-509 (1983) (senėjimas); Dainiah et al., Cancer, 51(6), 1101-1106 (1983) ir Schwartz et al., Otolaryngol., 109, 269-272 (1983) (įvairios neoplastinių būklių ligos, lydimos nenormalios eritropoezės).

Ankstesni bandymai gauti eritropoetinę su gera išeiga iš kraujo plazmos ar šlapimo yra santykinai nesėkmingi. Sudėtinga ir reikalaujanti tikslo laboratorinė technika paprastai gaunami maži užteršti ir nestabilių ekstraktų, turinčių eritropoetino, kiekiai.

JAV patente Nr.3033758 aprašytas būdas kaip dalinai išvalyti eritropoetinę iš avino plazmos, kai gaunama mažai bepriemaišinio eritropoetino ekstrakto, turinčio eritropoetino. Pirminiuose bandymuose išskirti eritropoetinę iš šlapimo gauti nestabilūs, biologiškai neaktyvūs hormono preparatai. JAV patente Nr.3865801 aprašytas būdas kaip stabilizuoti išskirtos iš šlapimo medžiagos, turinčios eritropoetino, biologinę aktyvumą. Gaunamas eritropoetino preparatas, pasižymintis 90 % eritropoetino aktyvumo ir yra stabilus.

Kitas eritropoetino išskyrimo iš ligonių, sergančių aplastine anemija, šlapimo būdas aprašytas Miyake et al., J. Biol. Chem., 252, 15 (1977 rugpjūčio 10) p.5558-5564 darbe. Ši septynių stadijų metodika apima jonų mainų chromatografiją, nusodinimą etanolio, gelio filtraciją, adsorbcinę chromatografiją. Gaunamas eritropoetinas, kurio aktyvumas 70400 V/mg baltymo, esant 21 % išeigai.

JAV patente Nr.4397840, išduotame Takezawa et al., aprašyti "eritropoetininio produkto gavimo" iš sveikų žmonių su skausmingais katijonitais šlapime būdai ir tvirtinama, kad gauti mažos molekulinės masės produktai "neturi inhibuojančio poveikio eritropoetinui".

Paraiškoje Didžiosios Britanijos patentui Nr.2085887, Sigimoto et al., išspausdintame 1982 m. gegužės 6 d., aprašytas būdas, kaip gauti hibridines limfoblastoidines žmogaus ląsteles ir pranešama, kad eritropoetino produkavimo lygis yra 3-420 vienetų/ml ląstelių suspensijos (paskirstytų kultūroje po dauginimo šeimininke-žinduolyje, esant 10^7 ląstelių/ml koncentracijai).

Esant pačiai aukščiausiai produkcijai, kuri kaip tvirtinama, turi būti pasiekta, eritropoetino produkavimo greitis sudaro nuo 40 iki 4000 vienetų/ 10^6 ląstelių per 48 val. in vitro kultūroje su vėlesniu ląstelių perkėlimu į dauginimo sistemas in vivo. (Žiūrėkite atitinkamą ekvivalentišką JAV patentą Nr.4377513).

Buvo daug pasiūlymų, kaip išskirti eritropoetinę iš audininių šaltinių, tačiau jo išeiga buvo labai maža. Žiūrėkite, pvz., darbus Jekman et al., Exp. Hematol., 11(7), 581-588 (1983); Tambaurin et al., P.N.A.S. (USA), 80, 6269-6273(1983); Katsuoka et al., Gann, 74, 534-541 (1983); Hagiwara

et al., Blood, 63(4), 828-835 (1984); ir Choppin et al., Blood, 64(2), 341-347 (1984).

Kitos išskyrimo technologijos, naudojamos gauti išvalytą eritropoetinę, apėmė imunologines metodikas. Poliklonas, esantis plazmos antikūnų dariniu, nukreiptu prieš eritropoetinę, vystosi injekuojant į žiurkę ar triušį žmogaus eritropoetinę. Injekuotas žmogaus eritropoetinas bus atpažintas kaip antigeninis svetimkūnis gyvulio imuninėje sistemoje ir sukels antikūnų gamybą prieš antigeną.

Skirtingos ląstelės, reaguodamos į stimuliavimą antigenine medžiaga, gamina ir paskleidžia kraujotakoje antikūnus, šiek tiek besiskiriančius nuo tų, kuriuos gamina kitos reaguojančios ląstelės. Kuomet gyvūno kraujas yra ekstrahuojamas, antikūnų aktyvumas jo plazmoje išlieka. Ir nors nevalyta plazma arba antikūnų preparatai, išvalyti kaip imunoglobulino G plazmos frakcija, po to gali būti panaudoti nustatant kompleksų susidarymą su žmogaus eritropoetinu, tai nėra patogu. Šis plazmos antikūnas, sudarytas iš įvairių skirtingų antikūnų, gaminamų atskirų ląstelių, pagal savo prigimtį yra polikloninis ir bendruose ekstraktuose su komponentais sudaro kompleksus kitaip negu vienetinis eritropoetinas.

Kuriant šį išradimą, domino naujausi pasiekimai tokių nepažeistų ląstelių kultūrų išauginimo srityje, kurios sugeba gaminti vienetinę antikūnų rūšį, specifiškai imunologiškai aktyvią pasirinkto antigeno vienetinės antigeninės determinantės atžvilgiu. Žiūrėkite darbą: Chisholm, High Technology, 3 t., Nr.1, p.57-63 (1983). Buvo mėginama panaudoti ląstelių susiliejimą bei hibridizacijos metodikas, skirtas "monokloninių" antikūnų vystymui į eritropoetinę bei šių antikūnų panaudojimui izoliavimui ir kiekybiniam žmogaus eritropoetino nustatymui. Kaip pavyzdį galima paminėti pranešimą, esantį anotacijos pavidale, darbe: Leo-Huang, Abstract Nr.1463, Fed. Proc., 41, p.520 (1982), kuriame kalbama apie sėkmingą ląstelių linijos pelė-pelė hibridomos sukūrimą, sugebančios išskirti žmogaus eritropoetinui monokloninius antikūnus. Kitu pavyzdžiu galėtų būti nuoseklus monokloninio priešpoetininio antikūno gavimo ir panaudojimo aprašymas darbe: Weiss et al., P.N.A.S. (USA), 79, 5465-5469 (1982). Taip pat žiūrėkite darbus: Sasaki, Biomed.

Biochim. Acta, 42/11/12. p.202-206(1983); Yanagawa et al., Blood, 64(2), 357-364(1984); Yanagawa et al., J.Biol.Chem. 259(5), 2707-2710(1984) bei JAV patentą Nr.4456624.

Kuriant išradimą taip pat domino pranešimai apie sintetinių peptidų imunologinį aktyvumą, kurie iš esmės dubliuoja aminorūgštinę seką, išlikusią laisvai randamuose baltymuose, glikoproteiduose bei nukleoproteiduose. Konkrečiau, polipeptidai su santykinai mažesne molekuline mase parodyti dalyvaujančiais imuninėse reakcijose, pagal trukmę artimoms fiziologiškai svarbių baltymų (kaip antai virusiniai antigenai, polipeptidiniai hormonai ir t.t.) imuninėms reakcijoms. Tarp tokių polipeptidų imuninių reakcijų yra ir specifinių antikūnų pas imunologiškai aktyvius gyvūnus susidarymo provokavimas. Žiūrėkite, pavyzdžiui, darbus: Lerner et al., Cell, 23,309-310(1981); Ross et al., Nature, 294, 654-656(1981); Walter et al., P.N.A.S. (USA), 77,5197-5200(1980); Learner et al., P.N.A.S. (USA), 78, 3403-3407(1981); Walter et al., P.N.A.S. (USA), 78, 4882-4886(1981); Wangetal, P.N.A.S. (USA), 78,7412-7416(1981); Breen et al., Cell, 28, 477-487(1982); Niggetac et al.; P.N.A.S. (USA), 79,5322-5326(1982); Baron et al., Cell, 28, 395-404(1982); Dresman et al., Nature, 295, 158-160(1982); Lerner, Scientific American, 248, Nr.2, 66-74(1983). Taip pat žiūrėkite darbą: Kaiser et al., Science, 223, p. 249-255(1984), liečiantį sintetinių peptidų imunologinį bei biologinį aktyvumą, kurie apytikriai atitinka antrines peptidinių hormonų struktūras, tačiau gali turėti skirtingą pirminę struktūrinę konformaciją. Žinoma, šie tyrinėjimai liečia kitų nei eritropoetinas baltymų aminorūgštinės sekas, nes apie pastarojo aminorūgštinę seką nebuvo paskelbta jokios esminės informacijos. Bendroje paraiškoje JAV patentui Nr.463724, pateiktoje J.Egrie 1983m. vasario 4d., bei publikuotoje 1984m. rugpjūčio 22d. Europos paraiškoje patentui Nr.0116446, aprašyta hibridomos pelė-pelė ląstelių linija (A.T.C.C. Nr.HB8209), kuri gamina labai specifinį monokloninį priešeritropoetininį antikūną, beje imunoneaktyvų polipeptidui, turinčiam šią aminorūgščių seką: $\text{NH}_2\text{-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Thr-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-COOH}$.

Polipeptidinė seka - tai tokia seka, kuri pririšta prie pirmųjų dvidešimties žmogaus subrendusio eritropoetino amino-

rūgščių liekanų, išskirta pagal metodiką, aprašytą darbe: Meyake et al., J. Biol. Chem., 252, 5558-5564 (1974), kuriai atlikta aminorūgščių analizė dujų faziniu sekvenseriu (Applied Biosystems) pagal metodiką: Hewik M., J. Biol. Chem., 256, 7990-7997 (1981). Taip pat žiūrėkite darbą: Sue et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 80, 3651-3655 (1983), aprašantį polikloninių antikūnų (prieš sintetinį 26-men besiskiriančio aminorūgščių seka pagrindu) vystymąsi, bei darbą: Sytowski et al., J. Immun. Methods, 69, 181-186 (1984).

Nors monokloniniai ir polikloniniai antikūnai, kaip aprašyta anksčiau, turi labai naudingų medžiagų imuniniams tyrimams, siekiant atrasti bei kiekybiškai nustatyti eritropoetinę, ir gali būti naudingi gryninant eritropoetinę, atrodo mažai tikėtina, kad šios stambaus masto išskyrimui skirtos medžiagos gali užtikrinti žinduolių kilmės eritropoetino kiekius, pakankamus tolimesnei analizei, klinikiams tyrimams ir galimai plačiam medžiagos terapiniam panaudojimui, gydant, pavyzdžiui, chroniškas inkstų ligas, kuomet pažeisti audiniai nebegali užtikrinti eritropoetino gamybos. Todėl spėjama, kad pilnai žinduolių eritropoetino charakteristikai bei didelių jo kiekių gamybai (galimai diagnostikai ir klinikiniam vartojimui) perspektyviausios yra rekombinantinės junginio stambaus masto mikrobinės sintezės metodikos.

Nors bandant išskirti DNR sekas, koduojančias žmogaus ir kitų žinduolių eritropoetinę, buvo nemažai stengiamasi, nė vienas bandymas nebuvo sėkmingas. Tai apsprendžiama trūkumu audinių (ypatingai žmogaus), tiek turtingų iRNR, kad būtų galima sumontuoti kDNR biblioteką, iš kurios (panaudojus žinomas metodikas) būtų galima išskirti eritropoetinę koduojančias DNR sekas. Be to, mažai žinoma apie nenutrūkstancias eritropoetino aminorūgščių liekanų sekas, ko pasėkoje negalima, pavyzdžiui, sumontuoti ilgų polinukleotidinių zondu, tinkamų patikimam DNR/DNR-hibridizuotai kDNR ir ypač DNR genominių bibliotekų atrinkimui. Dvidešimties aminorūgščių seka, naudojama anksčiau minėto monokloninio antikūno, generuoto A.T.C.C. Nr. HB8209, neleido sukonstruoti vienareikšmio šešiasdešimties bazių oligonukleotidinio zondo tokiu būdu, kuris

aprašytas Anderson et al., Supra. Nustatyta, jog žmogaus eritropoetinę koduojanti genetinė medžiaga, matyt sudaro mažiau nei 0,00005% bendros žmogaus genominės DNR, kuri turi būti genomineje bibliotekoje.

Sėkmingiausi šiai dienai žinomi bandymai sukonstruoti DNR sekas rekombinantiniais būdais, tinkančiais žinduolių eritropoetino izoliuojamų kiekių mikrobinei ekspresijai nė iš tolo nepasiekė tikslo. Pavyzdžiui galima paminėti darbą: Farber et al., Exp. Hematol, 11, Supp. 14, Abstract, 101(1983), kuriame pranešama apie iRNR ekstrakciją iš babuinių inkstų audinių, apdorotų fenilhidrazinu, bei iRNR injekcionavimu į Xenopus Laevis oocitus su gana laikinu "transliacinių produktų", kurie turėjo išreikštas eritropoetino biologines savybes, mišinio gavimui in vitro. Visai neseniai Farber et al., Blood, 62, Nr.5, Sapp. Nr.1, Abstract 392, p.122a(1983) pranešė apie žmogaus inkstų iRNR transliaciją in vitro varlės oocitais. Gautas transliacijos produkto mišinys buvo įvertintas, kaip turintis maždaug 220 mg transliacijos produkto, turinčio aktyvumą eritropoetino mikrogramui įvestos iRNR. Ir nors ekzogeninės iRNR, koduojančios eritropoetinę transliacijos in vitro lygmenys buvo pripažinti visiškai žemais (netgi palyginus su anksčiau paskelbtais babuino iRNR transliacijos į ieškomą produktą lygmenimis), nuspręsta, jog rezultatai patvirtina, kad žmogaus inkstas yra eritropoetino ekspresyvumo sritis, įgalinanti sumontuoti sodrintą žmogaus inksto kDNR-biblioteką, iš kurios galima išskirti norimą geną. [Žiūrėkite taip pat Farber, Clin. Res., 31(4), 769A(1983).]

Nuo to laiko, kai buvo paduotos paraiškos JAV patentams Nr.561024 ir Nr.582185, publikuotas tik vienintelis pranešimas apie to, kas pripažinta kaip žmogaus eritropoetino kDNR, klonavimą ir ekspresiją į E.Coli. Trumpiau kalbant, visa eilė kDNR klonų buvo įnešta į E.Coli plazmides, ir β -laktamazės susiliejimo produktai buvo pripažinti imunoreaktyviais (su monokloniniu antikūnu) žmogaus eritropoetino nenustatyto "epitopo" atžvilgiu. Žiūrėkite Lee-Huang, P. Nat. Acad. Sci.(USA), 81, p.2708-2712(1984).

TRUMPAS DĖSTYMAS

Pirmą sykį siūlomi nauji išgryninti bei išskirti polipeptidiniai produktai, pilnai arba dalinai turintys laisvai sutinkamo eritropoetino bei jo alelinių variantų konformaciją (t.y. nenutrūkstančią aminorūgštinių liekanų seką) ir vieną ar daugiau jo biologinių savybių (pvz., imunologinės savybės ir biologinis aktyvumas in vivo bei in vitro). Šie polipeptidai taipogi vienareikšmiai skiriasi tuo, jog yra prokariotinio arba eukariotinio šeimininko (pvz., bakterijų, mielių ar žinduolių ląstelės kultūroje) egzogeninių DNR sekų, gautų genomino ar kDNR-klonavimo arba genų inžinerijos būdu, ekspresijos produktas. Mikrobinės ekspresijos produktai stuburinių (pvz., žinduolių ir paukščių) ląstelėse gali skirtis kartu patekusiais baltymais ir kitais teršalais nuo žmogaus ir kurie gali asocijuotis su eritropoetinu jo natūralioje žinduolių ląstelių aplinkoje arba tokiose terpėse kaip kraujo plazma ar šlapimas. Tipiškų mielių (pvz., Saccaromyces arevisial) arba prokariotinių (pvz., E.Coli) šeimininko ląstelių produktai nesusiję su jokiais žinduolių baltymais. Priklausomai nuo pasirinkto šeimininko, siūlomi polipeptidai gali būti glikozilinti arba neglikozilinti žinduolių ar kitų eukariotinių angliavandeniais. Siūlomi polipeptidai taip pat gali turėti pradinio metionino aminorūgštinę liekaną (1 padėtyje).

Siūlomi nauji glikoproteininiai produktai apima tuos, kurie turi pirminę struktūrinę konformaciją, pakankamai dubliuojančią laisvai sutinkamo (pavyzdžiui žmogaus) eritropoetino konformaciją tam, kad būtų perimta viena ar daugiau pastarojo biologinių savybių, bei tuos, kurie turi besiskiriančią nuo laisvai sutinkamo (pvz., žmogaus) eritropoetino angliavandeninę kompoziciją. Stuburinių ląstelės (pvz., COS-I ir CHO) siūlomos šiame išradime, kaip nustatyta radioimuniniais tyrimais, gali be perstojo daugintis in vitro ir auginami kultūroje gali savo augimo terpėje produkuoti virš 1000 V (pageidautina virš 5000 V, o geriausiai virš 1000-5000 V) eritropoetino per 48 valandas, skaičiuojant 10^6 ląstelių.

Taip pat siūlomi sintetiniai polipeptidai, pilnai arba dalinai dubliuojantys nenutrūkstančias eritropoetino aminorūgštinių liekanų sekas. Šios sekos, atskiriant pirmines,

antrines arba tretines struktūrines ir konformacines charakteristikas, su laisvai sutinkamu eritropoetinu gali pasižymėti biologiniu aktyvumu ir/arba imunologinėmis savybėmis ir gali būti naudojamos kaip biologiškai aktyvūs arba imunologiniai eritropoetino pakaitalai terapiniuose ir imunologiniuose procesuose. Atitinkamai siūlomi monokloniniai ir polikloniniai antikūnai (gaminami standartiniais būdais), kurie yra imunoreaktyvūs tokiems peptidams ir, geriausiai, imunoreaktyvūs laisvai sutinkamam eritropoetinui.

Ši išradimą iliustruoja žmogaus ir beždžionės rūšinių pagrindų klonuotos DNR sekos, bei iš jų išskirtos polipeptidinės sekos ir, atitinkamai, atstovaujančios žmogaus ir beždžionės rūšinių pagrindų pirminę struktūrinę konformaciją.

Taip pat siūlomi nauji, biologiškai funkcionalūs virusinės ir žiedinės plazmidinės DNR vektoriai, apimantys išradimo DNR sekas, bei šių vektorių stabiliai transformuojami arba transfektuojami šeimininko mikrobiniai (pvz., bakterinės, mielinės bei žinduolių ląstelės) organizmai. Taigi siūlomi nauji naudingų polipeptidų gavimo būdai, apimantys tokių transformuojamų arba transfektuojamų mikrobinių šeimininkų kultivuojamą auginimą sąlygose, palengvinančiose egzogeninių vektorių DNR sekų plataus masto ekspresiją bei pageidaujamų polipeptidų išskyrimą iš maitinančios terpės, ląstelių lizatų ar ląstelių membranų frakcijų.

Mikrobinių polipeptidų išskyrimą ir gryninimą, siūlomus šiame išradime, galima realizuoti tradiciniais būdais, apimančiais, pavyzdžiui, preparatyvinius chromatografinius bei imunologinius atskyrimus, turinčius monokloninių ir/arba polikloninių antikūnų preparatus.

Išsiaiškinęs eritropoetino aminorūgščių liekanų seką, išradimo autorius siūlo pilną ir/arba dalinę struktūrą DNR sekų, koduojančių eritropoetiną ir turinčių tokias palankias charakteristikas, kaip kodonų, atrinktų "pageidaujamų" šeimininkų-nežinduolių ekspresijai, išskaidymo vietų paruošimą, naudojant ribojančius endonukleazinius fermentus, bei parūpinimą papildomų pradinių, galinių ar tarpinių DNR sekų, padedančių konstruoti lengvai išreiškiamus vektorius. Taigi siūlomas konstravimas (bei vystymas specifinės kDNR ir

genominės DNR mutagenezės būdu) DNR sekų, koduojančių mikrobinę ekspresiją tokių polipeptidinių analogų arba eritropoetino darinių, kurie skiriasi nuo laisvai sutinkamų formų vienos ar kelių aminorūgštinių liekanų skaičiumi arba vieta (t.y. analogų, turinčių mažesnę visų liekanų kiekį, rastą EPO, ir/arba pakeitimo analogų, kuriuose viena ar daugiau liekanų pakeistos kitomis, ir/arba papildomų analogų, kuriuose viena ar daugiau aminorūgštinių liekanų pridėta prie galinės ar vidurinės polipeptido dalies); ir kurie turi dalį arba visas laisvai sutinkamų formų savybes.

Siūlomos naujos DNR sekos apima visas sekas, tinkamas užtikrinti ekspresiją polipeptidinių produktų šeimininko prokariotinėse arba eukariotinėse ląstelėse, kurie turi bent dalį pirminės struktūrinės konformacijos ir vieną ar daugiau eritropoetino biologinių savybių, kurios apima: a) DNR sekas, pateiktas 5 ir 6 lentelėse, arba jų komplementarinius siūlus; b) DNR sekas, kurios hibridizuojamos (ilustruojamose čia, arba griežtesnėmis hibridizacijos sąlygomis) į (a) apibrėžtas DNR sekas ar jų fragmentus; c) DNR sekas, kurios genetinio kodo degeneracijos pasekoje turi hibridizuotis į (a) arba (b) apibrėžtas DNR sekas. Ypač apima (b) dalies genomines DNR sekas, koduojančias beždžionės ir žmogaus eritropoetino alelinių variantų formas ir/arba koduojančias kitų žinduolių eritropoetiną. Ypač apima (c) dalyje sumontuotas DNR sekas, koduojančias EPO, EPO fragmentus ir EPO analogus, kurių DNR sekos gali apimti kodonus, padedančius transliuoti informacinę RNR bestuburiuose šeimininkuose.

Siūlomame išradime apimama ta polipeptidų klasė, kuri koduojama DNR komplemento dalimis į viršutinę genomines DNR dalį, pateiktą 6 lentelėje, t.y. "komplementariškai invertuoti baltymai", kaip aprašyta darbe Tpmontano et al., Nucleic Acids Research, 12, p.5048-5059(1984).

Išradimas taip pat apima farmacines kompozicijas, turinčias veiklius šio išradimo polipeptidinių produktų kiekius kartu su tinkamais skiedikliais, stimulatoriais ir/arba nešikliais, įgalinančiais sukurti eritropoetino terapiją, ypač gydant aneminius ligų stovius ir, labiausiai, tokius aneminius stovius, kurie sukelia chronišką inkstų nepakankamumą.

Siūlomus polipeptidinius produktus galima "pažymėti" kovalentine asociacija su nustatoma žyminčia medžiaga (pvz., radiožymėtas ^{125}I), kad būtų galima identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti eritropoetinę kietame audinyje ar skystuose pavyzdžiuose, kaip antai kraujyje ar šlapime. DNR produktus taip pat galima pažymėti nustatomais "žymekliais" (pvz., radiožymės ir neizotopinės žymės, kaip antai biotinas) ir panaudoti DNR hibridizacijos procesuose lokalizuojant eritropoetinio geno padėtį ir/arba bet kurios giminingos geninės šeimos padėtį žmogaus, beždžionės ar kitų žinduolių chromosominiame žemėlapyje. Juos taip pat galima panaudoti identifikuojant eritropoetinio geno pažeidimus DNR lygmenyje bei panaudoti kaip geninį žymeklį identifikuojant kaimyninius genus ir jų pažeidimus.

Kaip smulkiai aprašyta anksčiau, šis išradimas užtikrina esminius aptikimo būdų patobulinimus specifiniams vienasisiūliams nežinomos sekos polinukleotidams, esantiems heterogeniniame ląsteliniame arba virusiniame pavyzdyje (apimančiame kartotinius vienasisiūlius polinukleotidus), kuriame:

a) gauna žymėtų vienasisiūlių polinukleotidų su tolygiai kintančiomis bazių ' sekomis zondų mišinį, be to kiekvienas iš nurodytų zondų yra potencialiai specifiškai komplementarus bazių sekai, kuri spėjamai unikali apatiniam polinukleotidui;

b) suriša pavyzdį su standžiu substratu;

c) apdoroja substratą (turintį surištą su juo pavyzdį), siekiant apsunkinti tolimesnį polinukleotidų surišimą;

d) apdorotą substratą (turintį surištą su juo pavyzdį) laikinai suliečia su minėtu žymėtų zondų mišiniu tokiomis sąlygomis, kurios skatina hibridizaciją tik tarp pilnai komplementarių polinukleotidų;

e) specifinį polinukleotidą aptinka pagal hibridizacijos reakcijos tarp jo ir pilnai komplementaraus zondo (esančio minėtame žymėtų zondų mišinyje) buvimą. Tai stebima žymėtosios medžiagos kiekio padidėjimu substrate su specifiniu polinukleotidu, lyginant su žymėtosios medžiagos kiekiu substrate be šio nukleotido.

Šios metodikos ypač efektyvios situacijose, kurios reikalauja naudoti 64, 128, 256, 512, 1024 ar daugiau

sumaišytų polinukleotidinių zondų, kurių ilgis DNR/DNR, RNR/RNR arba DNR/RNR hibridizacijose yra nuo 17 iki 20 bazių.

Kaip aprašyta infra, anksčiau minėtos patobulintos metodikos įgalino identifikuoti kDNR-klonus, koduojančius beždžionių eritropoetinę bibliotekos (gautos iš anemiškų beždžionių inkstų ląstelių iRNR) ribose. Konkrečiau 128 tolygiai kintančių 20-men zondų mišinys, paremtų aminorūgštinės sekos informacija, gauta iš besikaitaliojančių žmogaus eritropoetino frakcijų, panaudota kolonijų hibridizacijos metodikose identifikuojant septynis "teigiamus" eritropoetino kDNR klonus 200000 kolonijų. Netgi daugiau, šio išradimo patobulintų metodikų panaudojimo praktika įgalino greitai išskirti iš žmogaus genominę biblioteką sudarančių 1500000 sterilių dėmių ekranavimo ribų tris teigiamus klonus. Tai buvo atlikta panaudojant anksčiau minėtą 128 20-men zondų mišinį kartu su antru 128 17-men zondų rinkiniu remiantis aminorūgštine analize, pasižyminčia nenutrūkstančia žmogaus eritropoetino seka.

Anksčiau minėtos iliustracinės metodikos yra pirmasis žinomas pavyzdys, kuomet panaudojami mišrūs kartotiniai oligonukleotidiniai zondai DNR/DNR hibridizacijos procesuose, skirtuose žinduolių genominių klonų izoliavimui ir pirmasis žinomas pavyzdys, kuomet izoliuojant kDNR klonus panaudojamas daugiau nei 32 oligonukleotidinių zondų mišinys.

Daugelis išradimo aspektų bei privalumų specialistams taps akivaizdūs peržiūrėjus žemiau pateikiamą nuodugnų išradimo aprašymą, suteikiantį išradimo praktinio panaudojimo pavyzdį geriausiuose jo realizavimo variantuose.

NUODUGNUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Sutinkamai su šiuo išradimu buvo izoliuotos ir charakterizuotos DNR sekos, dalinai arba pilnai koduojančios žmogaus ir beždžionės eritropoetino polipeptidinę seką (toliau "EPO"). Be to, žmogaus ir beždžionės DNR tapo eukariotinės ir prokariotinės ekspresijos objektu, sukuriančios išskiriamus kiekius tokių polipeptidų, kurie pasižymi laisvai sutinkamo EPO biologinėmis (pvz., imuninėmis) savybėmis, bei EPO biologiniu aktyvumu in vivo ir in vitro.

Beždžionės rūšinių pagrindų DNR buvo išskirta iš kDNR bibliotekos, sumontuotos iRNR, kuri gauta iš chemiškai sukkelto aneminio būvio beždžionės inkstų audinio ir kurio serumas (kaip nustatyta imunologiniu būdu) turėjo aukštesnius EPO lygius nei normalios beždžionės serumas. Reikalingų kDNR klonų, turinčių EPO koduojančią DNR, izoliavimas buvo realizuotas panaudojant DNR/DNR hibridizacijos kolonijas bei rinkinį iš 128 sumaišytų, radiopažymėtų 20-men oligonukleotidinių zondų ir apėmė greitą 200000 kolonijų ekranavimą. Oligonukleotidinių zondų skaičiavimas rėmėsi aminorūgštinės sekos informacija, gauta iš fermentinės fragmentacijos ir nedidelio bandinio žmogaus EPO sekos nustatymo.

Žmogaus DNR buvo išskirta iš genominės žmogaus DNR bibliotekos. Klonų, turinčių EPO koduojančią DNR, izoliavimas realizuotas panaudojant DNR/DNR hibridizacijos dėmes bei anksčiau minėtus 128 mišrius 20-men oligonukleotidinius zondus ir antrą 128 radiožymėtų 17-men zondų rinkinį, kurių sekos rėmėsi aminorūgštinės sekos (gautos iš besiskiriančio fermentinio žmogaus EPO fragmento) informacija.

Teigiamos kolonijos ir dėmės buvo patikrintos klonalinės DNR sekos dideoksi - nustatymu, panaudojant 16 sekų rinkinį 20-men zondų pulo ribose, o atrinktų klonų nukleotidinė seka analizuojama su EPO polipeptidų pirminės struktūrinės konformacijos galutine dedukcija, koduojančia juos. Dedukuotos polipeptidinės sekos demonstravo aukštą homologiškumo laipsnį tiek viena kitos atžvilgiu, tiek ir daliai sekai, generuotai žmogaus EPO fragmentų aminorūgštinės analizės būdu.

Atrinktas teigiamas beždžionės kDNR klonas bei atrinktas teigiamas žmogaus genominis klonas buvo perkelti į šaudiklinį DNR vektorių, kurį amilifikavo į E.Coli ir panaudojo žinduolių ląstelių kultūroje transfekcijai. Kultūrinis transfektuotų šeimininko šeimininko ląstelių augimas atsispindėjo preparatuose, plaukiojančiuose kultūrinės terpės paviršiuje ir turinčiuose iki 3000 V EPO vienam kultūrinio skysčio ml.

Kiti pavyzdžiai pateikiami išradimo iliustravimui ir ypač akcentuojant metodikas, anksčiau realizuotas EPO identifikavimui, kurios koduoja beždžionės kDNR klonus ir žmogaus genominius klonus, bei imunologinį EPO ekspresijos tokiose sistemose patvirtinimą.

Konkrečiau, 1 pavyzdys skirtas žmogaus EPO fragmentų aminorūgštinės sekos nustatymui ir, remiantis šio sekų nustatymo rezultatais, radiožymėtų zondų mišinių montavimui. 2 pavyzdys daugiausia skirtas metodikoms, panaudotoms identifikuojant beždžionių teigiamus kDNR klonus ir padeda gauti informaciją apie gyvūnų gydymą bei jų serumo radioimunotyrimo (RIA) preliminarą analizę. 3 pavyzdys skirtas kDNR bibliotekos gavimui, hibridizacijos kolonijų ekranavimui ir teigiamų klonų patikrinimui, teigiamo kDNR klono DNR sekos nustatymui, o taip pat beždžionės EPO polipeptidų pirminės struktūrinės konformacijos (aminorūgštinės sekos) informacijos generavimui. 4 pavyzdys skirtas metodikoms, panaudotoms identifikuojant žmogaus teigiamus genominius klonus ir, tokiu būdu, užtikrina informaciją apie genominės bibliotekos šaltinį, dėmių hibridizacijos metodikas bei teigiamų klonų patikrinimą. 5 pavyzdys skirtas teigiamo genomio klono DNR sekos nustatymui ir informacijos apie žmogaus EPO polipeptidų aminorūgštinę seką generavimui (įskaitant palyginimą su beždžionės EPO seka). 6 pavyzdys skirtas metodikoms, įgalinančioms sumontuoti vektorių, apimantį EPO koduojančią DNR (kilusią iš beždžionės teigiamo kDNR klono), vektoriaus panaudojimui transfektuojant COS-I ląsteles bei transfektuotų ląstelių kultūriniam augimui. 7 pavyzdys skirtas metodikoms, įgalinančioms sumontuoti vektorių, apimantį EPO koduojančią DNR (kilusią iš žmogaus teigiamo genomio klono) vektoriaus panaudojimui transfektuojant COS-I ląsteles bei transfektuotų ląstelių kultūriniam augimui. 8 pavyzdys skirtas imuninių tyrimų metodikoms, realizuojamoms virš nuosėdų esančiose skystose terpėse, gautose transfektuotų ląstelių kultūrinio auginimo metu (pagal 6 ir 7 pavyzdžius). 9 pavyzdys skirtas mikrobiškai išreikšto EPO (6 ir 7 pavyzdžiai) biologiniam aktyvumui in vitro ir in vivo. 10 pavyzdys skirtas beždžionių EPO kDNR bei žmogaus genominės DNR ir žinduolių šeimininko ekspresijos sistemų vystymuisi, įskaitant kinietiško žiurkėno kiaušinėlių ląsteles (CHO) ir imunologiniam bei biologiniam šių ekspresijos sistemų produktų aktyvumui, o taip pat tokių produktų charakteristikai. 11 pavyzdys skirtas genų, kurie koduoja žmogaus EPO, EPO analogų, kurių genai turi eilę pageidautinų kodonų ekspresijai E.Coli ir mielinėse šeimininko

ląstelėse, gavimui, o taip pat tokios ekspresijos sistemoms. 12 pavyzdys priklauso imunologinio ir biologinio aktyvumo profiliams 11 pavyzdyje pateiktų sistemų produktuose.

1 PAVYZDYS

A.Žmogaus EPO fragmento aminorūgštinės sekos nustatymas

Žmogaus EPO išskiriamas iš šlapimo, kurį skaldo tripsinu ir gauna ir išskiria 17 atskirų fragmentų. Jų kiekiai yra apytiksliai 100-150 pikomolių.

Fragmentams laisvai priskiriami numeriai ir analizuojama jų aminorūgštinė seka naudojant dujinį sekvenserį (Applied Biosystems). Gauta aminorūgštinė seka, pateikta 1 lentelėje, kur panaudoti raidiniai kodai ir "X" reiškia vienareikšmiškai neapibrėžtą liekaną.

1 LENTELE

Fermento Nr.

Sekos analizēs rezultātas

5	T4a	A-P-P-R
	T4b	G-K-L-K
	T9	A-L-G-A-Q-K
	T13	V-L-E-R
	T16	A-V-S-G-L-R
10	T18	L-F-R
	T21	K-L-F-R
	T25	Y-L-L-E-A-K
	T26a	L-I-C-D-S-R
	T26b	L-Y-T-G-E-A-C-R
15	T27	T-I-T-A-D-T-F-R
	T128	E-A-I-S-P-P-D-A-A-M-A-A-P-L-R
	T130	E-A-E-X-I-T-T-G-X-A-E-H-X-S-L-
		N-E-X-I-T-V-P
	T31	V-Y-S-N-F-L-R
20	T33	S-L-T-T-L-L-R
	T35	V-N-F-Y-A-W-K
	T38	G-Q-A-L-L-V-X-S-S-Q-P-W-
		E-P-L-Q-L-H-V-D-K
25		
30		
35		

B.Oligonukleotidinių zondų mišinių skaičiavimas ir montavimas

Aminorūgštinės sekos, pateiktos 1 lentelėje, nagrinėjamos genetinio kodo degeneracijos aspektu siekiant išsiaiškinti mišrių zondų metodikos panaudojimo galimybes DNR/DNR hibridizacijai kDNR ir/arba DNR genomines bibliotekose. Ši analizė parodo, jog fragmento Nr.T-35 ribose egzistuoja 7 aminorūgštinių liekanų eilė (Val-Asn-Phe-Typ-Ala-Trp-Lys), kurią vienareikšmiškai galima charakterizuoti kaip koduojamą vieną iš 128 galimų DNR sekų, apimančią 20 azotinių bazių porų. Todėl sintetinamas pirmas rinkinys iš 128 20-men oligonukleotidų, panaudojant standartinius fosfoamidinius būdus (žiūrėkite, pavyzdžiui, darbą Beaucage et al., Tetrahedron Letters, 22, p.1859-1862(1981), panaudojant kieta nešiklį ir sutinkamai su 2 lentelėje pateikiama seka.

2 LENTELĖ

Liekana	- Val	- Asn	Phe	Typ	Ala	Trp	Lys	
3'	CAA	TT	AAG	AT	CGA	ACC	TT	- 5'
	T	A	A	A	T			
	G				C			
	C				C			

Papildoma analizė atskleidžia, jog fragmento Nr.T-38 ribose egzistuoja 6 aminorūgštinių liekanų eilė (Gln-PnO-Tnp-Glu-PrO-Leu), kurios pagrindu galima gauti 128 mišrių oligonukleotidinių 17-men zondų pulą, kaip parodyta 3 lentelėje.

3 LENTELĖ

Liekana	- Gln	Pno	Tnp	Glu	Pro	Leu	
3'	GTT	GGA	ACC	CTT	GGA	GA	- 5'
	C	T		C	T	A	
		C			C		
		C			C		

Oligonukleotidinius zondus 5' gale pažymi gama -32p-ATP, 7500-8000 C_i (mmol/JCN), panaudojant polinukleotidinę kinazę T₄ (NEN).

2 PAVYZDYS

A. Beždžionių apdorojimo metodikos ir RIA-analizė

Beždžionių Macaca fascicularias patelės Cynomologus (2,5-3 kg, 1,5-2 metai) apdoroja poodinėmis fenilhidrazino chlorhidrato tirpalo (pH 7,0) injekcijomis, dozuojant 12,5 mg/kg 1,3 ir 5 dieną. Prieš kiekvieną injekciją kontroliuojamas hematokritas. 7-tą dieną (arba kai tik hematokrito lygis nukrenta žemiau 25% pirminio lygio), suleidžiamas ketamino chlorhidratas (dozuojant 25 mg/kg) ir paaimamas serumas bei inkstai, kurie iš karto užšaldomi skystu azotu ir laikomi -70° C temperatūroje.

B. RIA - analizė

Kiekybiniam EPO nustatymui pavyzdžiuose naudojami radioimuniniai tyrimai pagal šias metodikas:

Eritropoetino standartas arba nežinomas pavyzdys dvi valandas inkubuojamas kartu su antiserumu 37° C temperatūroje. Po to mėgintuvėliai su pavyzdžiais atšaldomi ledu, pridedama ¹²⁵I pažymėto eritropoetino, ir inkubuojama ne mažiau 15 valandų 0° C temperatūroje. Kiekviename tiriamame mėgintuvėlyje yra 500 mkl inkubacinio mišinio, kuriame yra praskiesta: 50 mkl imuninio serumo, 10000 cp ¹²⁵I-eritropoetino, 5 mkl trasilolio ir 0-250 mkl EPO standarto (arba nežinomo pavyzdžio), o taip pat PBS, turinčio 0,1% BSA, likusio tūrio užpildymui. Naudojamu serumu yra antrame mėginyje nuleistas triušio kraujas, imunizuotas 1% gryno žmogaus šlapimo eritropoetino preparatu. Galutinis antiserumo praskiedimas yra reguliuojamas, kad ¹²⁵I-eritropoetino, surišto su antikūnu, kiekis neviršytų 10-20% bendro kiekio. Aplamai, tai atitinka galutinį antiserumo praskiedimą nuo 1:50000 iki 1: 100000.

^{125}I -eritropoetiną, surištą su antikūnu, nusodina pridėjus 150 mkl Staph A. Po 40 minučių inkubavimo pavyzdžiai centrifuguojami, atskirtos nuosėdos du kartus plaunamos 0,75 ml 10 mM Tris-HCl tirpalo (pH 8,2), turinčio 0,15 M NaCl, 2 mM EDTA ir 0,05% Triton X-100. Nustatant ^{125}I -eritropoetino ryšio procentą, matuojamas išplautų nuosėdų gama spinduliavimo intensyvumas. Nespecifinio nusodinimo korekcijai, kiekiai, surišti pre-imuninių serumų yra išskaičiuojami iš rezultatų. Nežinomuose pavyzdžiuose esantis eritropoetinas nustatomas lyginant su standartine kreive.

Šioje metodikoje naudojamas beždžionių serumas gautas pagal A dalyje aprašytą būdą. Normalaus serumo lygmenys, kaip nustatyta, apytiksliai yra 36 mV/ml, tuo tarpu apdorotų beždžionių serumas siekia nuo 1000 iki 1700 mV/ml.

3 PAVYZDYS

A. Beždžionių kDNR bibliotekos montavimas

Informacinę DNR išskiria iš normalių ir anemiškų beždžionių inkstų panaudojant guanidino tiocianatą pagal metodiką, aprašytą darbe Chirgwin et al., Biochemistry, 18, p.5294(1979), ir poli/A/ iRNR valo du kartus praleidžiant per chromatografinę kolonėlę, užpildytą oligo /dT/-celiulioze, kaip aprašyta 197-198 psl. darbo Maniatis et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs, Harbor, N.Y., 1982). kDNR biblioteka montuojama pagal šiek tiek pakeistas pagrindines metodikas, aprašytas darbe Okayama et al., Mol. and Cell. Biol., 2, p.161-170(1982). Šiuo metu pripažintų metodikų esminiai momentai yra: 1) pVC8 naudojamas pagrindo vektoriumi, perpjaunama Pst1 ir po to, naudojantis oligo dT, sukuriama 60-80 bazių ilgio uodega; 2) HindII išskaidymas naudojamas atkabinant oligo dT uodegą nuo vieno vektoriaus galo; 3) pirmo siūlo sintezė ir uodegos prijungimas, naudojant oligo, realizuojamas pagal publikuotą metodiką; 4) BamHI išskaidymas naudojamas atkabinant oligo dC-uodegą nuo vieno vektoriaus galo; 5) RNR siūlo pakeitimas į DNR realizuojamas dalyvaujant dviem rišančioms grandims (GATCTAAAGACCGTCCCCCCCC ir ACGGTCTTTA) su trigubu moliariniu pertekliumi, lyginant su oligo dG-uodegą turinčiu vektoriumi.

B.Kolonijų hibridizavimo metodikos, skirtos beždžionių
kDNR bibliotekos skryningui

Į 10x10 cm dydžio lėkšteles su maitinančia terpe, turinčia 50 mkg/ml ampicilino, tolygiai išbarstoma 9000 kolonijų transformuotų E.Coli. Genescreen filtrus (New England Nuclear Catalog - 1972) iš anksto sudrėkina BHJ-CAM lėkštelėje (37 g/l baktoekstrakto smegenys/širdis, 2 g/l Casamino rūgščių ir 15 g/l agarų, turinčio 500 mkg/ml chloramfenikolo) ir naudoja lėkštelėse esančių kolonijų maitinimui. Kolonijos auginamos toje pačioje terpėje 12 ar daugiau valandų, siekiant amplifikuoti plazmidinių kolonijų skaičių. Amplifikuotas kolonijas (jų šonus) apdoroja, patalpinus filtrus virš dviejų 3 mm storio vatmano gabaliukų, įmirkytų šiuose tirpaluose:

- 1) 50 mM gliukozės, 25 mM Tris-HCl(pH8,0), 10 mM EDTA(pH8,0) - 5 minutes
- 2) 0,5 M NaOH - 10 minučių
- 3) 1,0 M Tris-HCl(pH7,5) - 3 minutes.

Vėliau filtrai 2 valandas džiovinami vakuume 80° C temperatūroje. Po to filtrai skaidomi proteinaze K, apdorojant tirpalu, turinčiu 50 mkg/ml proteazinio fermento buferyje K[0,1 M Tris-HCl(pH8,0) - 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA(pH8,2) - 0,2% SDS]. Konkrečiai, ant kiekvieno filtro užlašinami 5 ml tirpalo ir skaidymą tęsia 30 minučių 55° C temperatūroje, o po to tirpalą pašalina.

Vėliau filtrai apdorojami 4 ml parengtinės hibridizacijos buferiu (5xSSPE - 0,5%, SDS - 100 mkg/ml SS, E.Coli DNR - 5xBFP).

Parengtinė hibridizacija vykdoma 55° C temperatūroje 4 arba daugiau valandų, o po to tirpalas pašalinamas.

Hibridizacijos procesas vykdomas tokiu būdu. Į kiekvieną filtrą pridedama po 3 ml hibridizacinio buferio (5xSSPE - 0,5%, SDS - 100 mkg/ml SS, mielių tRNR), turinčio po 0,025 pikomolius kiekvienos iš 128 zondų sekos, pateiktų 2 lentelėje (pilnas mišinys pažymėtas EPY), o filtrai 20 valandų laikomi 48° C temperatūroje. Ši temperatūra 2° žemesnė, nei bet kurio iš zondų disociacijos temperatūra (Td).

Pasibaigus hibridizacijai, filtrai tris kartus po 10 minučių plaunami 6xSSC-0,1% SDS tirpalu kambario temperatūroje, o po to 2-3 kartus 6xSSC-0,1% SDS tirpalu hibridizacijos temperatūroje (48° C).

Tarp pasėtų 200000 kolonijų filtrų autoradiografijos būdu randami septyni teigiami klonai.

Vieno iš menamų beždžionės kDNR klonų (pažymėti - klonas 83) pradinės sekos analizė atliekama taikinių patikrinimui pakoreguota metodika, aprašyta Wallace et al., Gene, 16, p.21-26(1981). Trumpiau, DNR-plazmidę iš beždžionės kDNR klono 83 linearizuoja skaidydami EcoRI ir denatūruoja kaitindami vonioje su verdančiu vandeniu. Nukleotidinę seką nustato dideoksi - būdu, aprašytu Sanger et al., P.N.A.S.(USA), 74, p.5463-5467(1977). EPV-mišinio zondų rinkinys, sudarytas iš 16 sekų, naudojamas sekų reakcijų inicijavimui.

C.Beždžionės EPO kDNR sekos nustatymas

Klono 83 nukleotidinių sekų analizė atliekama pagal metodikas, aprašytas Messing, Methods in Enzymology, 101, p.20-78 (1983). 4 lentelėje pateikti parengtinio ribojimo žemėlapių analizės rezultatai, nustatyti EcoRI/HindIII klono 83 klonuotam fragmentui, turinčiam maždaug 1600 paramiazotinių bazių. Nukleotidinė seka nustatoma randant atskirų ribojančių fragmentų sekas, siekiant suporuoti persiklojančius fragmentus. Pavyzdžiui, sekos informacijos persiklojimas, pateiktas ribojančio fragmento nukleotidų analizėje, žymimas CII3 (Sau 3A prie ~ III/SmaI prie 324), o sekos su priešinga tvarka nustatymas žymimas C73 (AluI prie ~424/BstFII prie ~203).

4 LENTELEApribojančio fermento
indentifikavimo sritisApytikris radimas(ai)

5	<u>EcoRI</u>	1
	<u>Sau3A</u>	111
	<u>SmaI</u>	180
	<u>BstEII</u>	203
	<u>SmaI</u>	324
10	<u>KpnI</u>	371
	<u>RsaI</u>	372
	<u>AluI</u>	424
	<u>PstI</u>	426
	<u>AluI</u>	430
15	<u>HpaI</u>	466
	<u>AluI</u>	546
	<u>PstI</u>	601
	<u>PvuII</u>	604
	<u>AluI</u>	605
20	<u>AluI</u>	782
	<u>AluI</u>	788
	<u>RsaI</u>	792
	<u>PstI</u>	807
	<u>AluI</u>	841
25	<u>AluI</u>	927
	<u>NcoI</u>	946
	<u>Sau3A</u>	1014
	<u>AluI</u>	1072
	<u>AluI</u>	1115
30	<u>AluI</u>	1223
	<u>PstI</u>	1301
	<u>RsaI</u>	1343
	<u>AluI</u>	1384
	<u>HindIII</u>	1449
35	<u>AluI</u>	1450
	<u>HindIII</u>	1585

Maždaug 1342 azotinių bazių (ribose nuo 3' iki EcoRI bei HindIII) sekos nustatymas ir visų galimų nuskaitymo sistemų analizė padeda vystyti DNR ir 5 lentelėje pateiktos aminorūgštinės sekos informaciją. Lentelėje subrendusio EPO aminogalūnės menama pirminė aminorūgštinė liekana (kaip patikrinta dvidešimties amino-galūnių liekanų sekos anksčiau minėtos analizės koreliacijos būdu) žymima skaitmeniu 41. Apsprendžiančio metionin-ATC kodono (pažymėtas - 27) buvimas, "nukreipto prieš tėkmę" pirminio amino galutinės alanininės liekanos, kaip pirmos liekanos, pažymėtos subrendusio baltymo aminorūgštinei sekai, yra tikroviškumo rodiklis to, kad EPO pradžioje išreikštas citoplazmoje pirmtako pavidale, apimančiame "lemiamą" 27 aminorūgštinių liekanų sritį, kuri išpjaunama prieš patenkant subrendusiam EPO į kraujotaką. Potencialaus glikozidavimo sritys polipeptido ribose pažymėtos žvaigždutėmis. Transliavimo srityje apskaičiuota molekulinė masė yra 21117 Daltonų, o 165 polipeptido liekanų, sudarančių beždžionės subrendusį EPO, molekulinė masė yra 18236 Daltonai.

5 IDENTIFĒ

Bezdžionēs KDNR EPO translaciā

SauJA
GATCCCGCCCCCTGACAGCCGCTCTCTCCAGGCGGCTGGGCTGCCCCTCCCC
CGCTGACCTCCCGGATGAGGACTCCCGGTGTGTACCCGCGGCTAGCTGCTGAG

-27

-20

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp
GGACCCCGCCAGCGCGGAGATG GGG CTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG

-10

Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro
CTG TGG CTT CTC CTG TCT CTC GTG TCG CTC CTT CTG GGC CTC CCA

-1 +1

10

Val Pro Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu
GTC CCG GGC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG

20

Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Val Thr Met
GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG GAG GCC GAG AAT GTC ACG ATG

30

40

Gly Cys Ser Glu Ser Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro
GGC TGT TCC GAA AGC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACC GTC CCA

5 LENTELE (tesinys)

50
 Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
 GAC ACC AAA GTT AAC TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG
 60
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu
 CAG CAG GCT GTA GAA GTC TGG CAG GCC CTG GCC CTG CTC TCA GAA
 70
 80
 *
 Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Val Leu Ala Asn Ser Ser Gln Pro
 GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC GTG TTG GCC AAC TCT TCC CAG CCT
 90
 Phe Glu Pro Leu Glu Leu His Met Asp Lys Ala Ile Ser Gly Leu
 TTC GAG CCC CTG CAG CTG CAC ATG GAT AAA GCC ATC AGT GGC CTT
 100
 110
 Arg Ser Ile Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Glu Ala
 CGC AGC ATC ACC ACT CTG CTT CGG GCG CTG GGA GCC CAG GAA GCC
 120
 Ile Ser Leu Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Arg ACC ATC
 ATC TCC CTC CCA GAT GCG GCC TCG GCT GCT CCA CTC CGA ACC ATC
 130
 140
 Thr Ala Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe
 ACT GCT GAC ACT TTC TGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC

5 LENTELI² (tesins)

150 Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Arg
CTC CCG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACG GGG GAG GCC TGC AGG AGA

165

Gly Asp Arg OP
GGG GAC AGA TGA CCAGGTGCGTCCAGCTGGGCACATCCACCACCTCCCTCACCACA

CTGCCGTGTGCCACACCCTCCCTCACCACCTCCCGAACCCCATGAGGGGCTCTCAGCTAAG

CGCCAGCCCTGTCCCATGACACTCCAGTGGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAAC
TGTCAGAGCACAACTCTGAGATCTAAGGATGTCGAGGGCCAACTTGAGGGCCAGAGC
AGGAAGCATTCAGAGAGCAGCTTTAACTCAGGAGCAGAGACAATGCAGGGAACACCT
GAGCTCACTCGGCCACCTGCAAAATTTGATGACAGACACGCTTTGAGGCAATTACCTG
TTTTGCACCTACCATCAGGACAGGATGACTGAGAACTTAGGTGGAAGCTGTGACTT
CTCAGGCCCTACGGGCACCTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACACTGAGAGAATATT
TTGCAATCTGCAGCAGGAAATAATTACGACAGAGTTTGGAGTTGAGGTACTTGACAG
GTGTGTGGGAAGCAGGGGGTAGGGGTGAGCTGGGATGGAGTGAGAACCGTGAAGAC
AGGATGGGGGCTGGCCCTCTGGTTCTGCTGGGGTCCAAGCTT

HindIII

5-tos lentelės polipeptidinė seka gali būti nesunkiai analizuojama, ieškant ypatingai hidrofiliinių sričių ir/arba antrinių konformacinių charakteristikų (kurios yra potencialiai labai imunogeninių sričių rodiklis) būdais, pasiūlytais Hopp et al., P.N.A.S. (USA), 78, p. 3824-3828 (1981), Kute et al., J. Mol. Biol., 157, p. 105-132 (1982) ir/arba Chou et al., Biochem., 13, p. 222-245 (1974) bei Advances in Enzymology, 47, p.45-47 (1976). Analizės kompiuterizacija Hopp et al., būdu tampa galima, naudojant programą, pažymėtą PEP Reference Section 6,7, pateiktą Intelligenetics, Inc., 124 University Avenue, Palo Alto, California.

4 PAVYZDYS

A. žmogaus genominė biblioteka

Žmogaus fetalinių kepenų genominę biblioteką (turinčią AhC4A fagą), gautą pagal Lown et al., Cell, 18, p.533-543 (1979) metodikas, išsaugo dėmių hibridizacijos tyrimams.

B. Dėmių hibridizacijos metodikos, skirtos žmogaus genominės bibliotekos pasėjimui

Fagų daleles lizuoja ir DNR fiksuoja ant filtrų (50000 dėmių ant filtro) pagal metodikas, aprašytas Woo, Methods in Enzymology, 68, p.389-395 (1979), su išimtimi, kad naudojami Gene Screen Plus filtrai (New England Nuclear Catalog Nr.NET-976) bei NZYAM lėkštelės (NaCl - 5 g/l, MgCl₂·6H₂O - 2 g/l, NZ-AminA - 10 g/l, mielių ekstraktas - 5 g/l, casamino rūgštys - 2 g/l, maltozė - 2 g/l, agaras - 15 g/l).

Ore išdžiovintus filtrus pakaitina 1 valandą 80 °C temperatūroje, o po to skaido proteinaze K, kaip aprašyta 3 pavyzdžio B dalyje. Parengiamoji hibridizacija vykdoma 55 °C temperatūroje, naudojant 1 M NaCl - 1 % SDS buferį, 4 arba daugiau valandų, o po to buferis pašalinamas. Hibridizaciniai ir pohibridizaciniai perplovimai vykdomi kaip ir 3 pavyzdžio B dalyje. Naudojamas tiek 128 20-men zondų mišinys (pažymėtas EPO), tiek ir 3 lentelės 128 17-men zondų mišinys (pažymėtas

EPQ). Naudojant EPV zondų mišinį, hibridizacija vyksta 48^o C temperatūroje, o naudojant EPO zondų mišinį - 46^o C temperatūroje, t.y. 4^o žemiau apskaičiuotos mišinio komponentams Td. Pakartotinei hibridizacijai pašalinami hibridizuoti zondai virinant 1xSSC - 0,1% SDS terpėje 2 minutes. Filtrų autoradiografija atranda tarp pasėtų 150000 faginių dėmių tris teigiamus klonus (aktyvius su abiem zondų mišiniais). Teigiamų klonų patikrinimas EPO-kodavimui realizuojamas DNR sekų nustatymu bei heterodupleksinės formacijos su 3 pavyzdžio beždžionės kDNR elektronine mikrografine vizualizacija. Ši metodika taip pat įrodo kartotinių intronų buvimą DNR sekoje.

5 PAVYZDYS

Atliekama teigiamų klonų nukleininų sekų (žymimų hE1) analizė ir rezultatai, gauti iki šios dienos, pateikiami 6 lentelėje.

6 LENTELE

AAGCTTCTGGGCTTCCAGACCCAGCTACTTTGCGGAACCTCAGCAACCCAGGCATCTCTGAGTCTCCGCCCA
 AGACCGGGATGCCCCCAGGGGAGGTGTCCGGGAGCCAGCCTTTCCAGATAGCACGCTCCGCCAGTCCC
 AAGGTTGCCCAACCGGCTGCACTCCCCCTCCCGGACCCAGGGCCCGGAGCAGCCCCCATGACCCACACGC
 ACGTCTGCAGAGCCCGCTCAGGCCCGGGGAGCCTCAACCCAGGCGTCTTCCCCCTGCTCTGACCCCGG
 GTGGCCCCTACCCCTGGCGACCCCTCAGGCACACAGCCTCTCCCCCACCCTCCCGGCGCACACATG
 CAGATAACAGCCCCGACCCCGGCCAGAGCCGXAGAGTCCCTGGGCCACCCCGGCGCTCGCCTGCCGCTG
 CGCGCACCGGCTGTCTCCCGGAGCCGGGACCGGGCCACCGCGCCXGCTCTGCTCCGACACCGCGCCC
 CTGGACAGCCGCCCTCTCTCTAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGCACCGCCGAGCTTCCCGGATGAGGX
 CCGGGTGACCGCGCGCCCCAAGTGGCTGAGGGACCCCGGCCAAGCGCGGAG
 GTGAGTACTCGCGGGCTGGGGCTTCCGGCGCGCGGTCTCTGTGAGCGGGGATTTAGCGCCCCGGCT

-27 Met Gly Val His
 -24 ATG GGG GTG CAC G

ATTGCCCAAGAGGTGGCTGGGTTCAAGACC GGCGACTGTCAAGACC CCGGAAGGGGAGGGGGTGGC
GCAGCCTCCACGTCGCCCGGGGACTTGGGGAGTCTTGGGATGCCAAAACCTGGCCCTGTAGGGGCA
CAGTTGGGCTTGGGAGGAGTTGGGCTCTGCTGTGAGTTGTGCTGTGAGTGTCTCG[I.S.]
TTGCACACGCACAGATCAATAAGCCAGAGCGCAGCACC TGAGTCTTGCAITGCTGGGACAGGAAGCAGAG
CTGGGGCAGAGACGTGGGGATGAAGGAAGCTGTCTCTCCACAGCCACCCTCTCCCCCCCCCGCTGACTCT

-23
 Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 AA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG
 CAGCCCTGGCTATCTGTTCTAG

-10° Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys
 CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT

Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
 GAC AGC CGA GTC CTC GAG ACC TAC CTC TTG CAG GCC AAG GAG GCC GAG AAT ATC

26
Thr
ACG GTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCAGGCTCAGGGAACCTCCTCCAGAI

CCAGGAACCTGGCACTTGGTTGGGCTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCCCTACATAGAGATAGTTC

6 LENTELE (tesinys)

TGGTGGCCCCAAACCATACCTGAACCTAGGCAAGGAGGCAAGCCAGCAGATCCTACGCCCTGTGGGCCAGGG

27 30

Thr Gly Cys Ala Glu
ACG GGC TGT GCT GAA

CCAGAGCCCTTCAGGCTCCCTTIGACTCCCGGGCTGTGTGCATTTCAG

40

*

His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr
CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT

55

Ala Trp Lys Arg Met Glu
GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTTCTTTTGGAGAATCTCATTT

39

TGGGAGCCCTGATTTTGGATGAAAGGGAGAAATGATCGGGGGAAGGTAAATGGAGCAGCAGAGATGAGGCT

GCCTGGGGCCAGAGGGCTCACGCTCTATAATCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT

GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATTTAAAAAATTAGTCAG

GTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATAATTTGGAAGGCTGAGCGGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAA

TTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACCTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCA

LT 4012 B

6 LENTELĖ (tesinys)

AAAAAGAAAAGAAAACAAAATATGAGGCTGTATGGAATACATTCAATTCACTCACTCACT
CACTCAATTCAATTCAATTCAACAACAGCTTATTCATACCTTCGTTGCTCAGCTTGGTCTGG
GCCTGCTGAGGGCAGGAGGAGGGTGACATGGGTGACCTGACCTCCAGAGTCCACTCCCTGTAG

56 Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
GTC GGG CAG CAG GCC GTA GAA GTC TGG CAG GCC CTG GCC CTG TCG GAA GCT

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu
GTC CTG CCG GGC CAG GCC CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG

Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu
CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT GGC CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT

110 Arg Ala Leu Gly Ala Gln 115
CGG GCT CTG GGA GCC CAG GTGAGTAGGAGCGGACACTTCCTTCCCTTCTGTAGAAGGGA

GAAGGCTCTGCTAAGGAGTACAGCACTGTCCGTAATTCCTTCCCTTCTGTGACACTGACGACCTCCT

116 Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
GTTTCTCTCCTTGGCAG AAG GAA GCC ATC TCC CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT

6 LENTELE (tesinys)

130 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser
CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC

150 Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly
AAT TTC CTC CGG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC TGC AGG ACA GGG

166 Asp Arg OP
GAC AGA TGA CCAGGTGTGTCCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACCACCAATTTGCTTGCCACACA

CCCTCCCCCGCCACTCCTGAACCCCGTCGAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCCTGTCCCATGGACACTCC

AGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAACCTGTCCAGAGAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCAC

AGGGCCAACTTGAAGGGCCCCAGAGCAGGAAGCAATTCAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCCATGC

TGGGAAGACGCCCTGAGCTCAGCTCGGCACCCCTGCCAAATTTGATGCCAGGACACGCTTTGGAGGCGGATTTAC

CTGTTTTCCGACCCTACCATCAGGGACAGGATGACCTGGAGAACCTTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAGG

TCTCAGGGGCATGGGCACCTCCCTTGGTGGCAAGAGGCCCCCTTGACACCGGGTGGTGGGAACCATGAAGAC

AXGATXGGGGCTGGCCCTCTGGCTCTCATGGGGTCCAAGTTTTTGTTATTTCTCAACCTATTGACAGACTGAA

ACACAATATGAC

6 lentelėje pirminė nepertraukiama DNR seka pažymi viršutinę 620 bazių grandinę taip, kad, matyt, yra netransliuojama seka, po kurios tuoj pat seka transliuojama žmogaus EPO geno dalis. Tiksliau, seka susideda iš 5 galų geno, kuris veda prie transliuojamos DNR dalies, koduojančios pirmas 4 aminorūgštis (nuo -27 iki -24) "lyderio" sekoje ("pre-seka"). Keturios azotinių bazių poros sekoje, einančioje prieš pastarąją, koduoja lyderio pradžią, tačiau dar nenustatytos vienareikšmiai ir todėl žymimos "X". Po to seka intronas, susidedantis maždaug iš 639 porų azotinių bazių (439 bazių poroms nustatyta seka, o kitoms 200 bazių porų žymima "I.S."), už kurio tuoj pat seka glutamino kodonas, kuris vaizduojamas kaip -23 transliuoto peptido liekana. Toliau einanti egzono seka koduoja aminorūgščių liekanas per adenino liekanas (žymimas kaip subrendusio EPO geno +1 aminorūgščių liekana) iki kodono, nusakančio treoniną +26 padėtyje, po to seka antras intronas, susidedantis iš 256 bazių, kas specifiškai ir pažymėta. Sekanti už šio introno egzono seka 27-55 aminorūgščių liekanoms, tęsiasi trečiu intronu, susidedančiu iš 612 porų azotinių bazių. Toliau einantis egzonas koduoja 56-115 žmogaus EPO liekanas. Po jo eina ketvirtasis intronas iš 134 porų azotinių bazių, kurias pratęsia egzonas, koduojantis 116-166 liekanas, ir "sustabdymo" kodonas (TGA). Galiausiai 6 lentelėje identifikuojama 568 porų azotinių bazių seka taip, kad susideda iš netransliuojamos srities 3' žmogaus EPO geno. Dviejų azotinių bazių porų ("X") eiliškumas nėra vienareikšmiškai nustatytas.

6 lentelė leidžia identifikuoti subrendusio žmogaus EPO konformacijos (aminorūgščių sekos) pirminę struktūrą, kuri susideda iš 166 nustatytų aminorūgščių liekanų (su nustatyta molekuline mase = 18399). Lentelėje taip pat pavaizduota DNR seka, koduojanti lyderio seką iš 27 liekanų kartu su DNR seka 5' ir 3', kuri gali būti reikšminga promotoriaus/operatoriaus funkcijai, vykdomai geno operatoriaus. Segmentai potencialiam žmogaus EPO polipeptido glikozidiniui lentelėje pažymėti žvaigždutėmis. Būtina pažymėti, kad 6 lentelėje specifinė aminorūgščių seka, tikriausiai, sudaro laisvai randamos žmogaus eritropoetino alelinės formos seką. Pagrindimas tokiam teigimui yra nenutrūkstamų bandymų rezultatai, gauti nustatant žmogaus

šlapimo eritropoetino izoliatų seką, kuri leidžia disponuoti tokia informacija, kad žymi eritropoetino molekulių dalis turi metioniną 126-je liekanoje kaip priešpriešą serinui, kas pavaizduota lentelėje.

7 lentelė iliustruoja homologijos laipsnį tarp žmogaus ir beždžionės polipeptidinės sekos. Viršutinėje nepertraukiamoje lentelės linijoje raidiniai žymėjimai panaudoti tam, kad žmogaus EPO dedukuotas ir transliuotas sekas, pradedant nuo -27 liekanos. Apatinė nepertraukiama linija vaizduoja beždžionės EPO dedukuotą polipeptidinę seką, prasidedančią nuo 27-to skaičiaus, reiškiančio liekaną. Žvaigždutės naudojamos sekų homologijai pažymėti. Reikia pažymėti, kad žmogaus ir beždžionės EPO dedukuotas polipeptidinės sekos išryškina "papildomą" lizino (k) liekaną 116 padėtyje (žmogui). Nuoroda į 6 lentelę, reiškia, kad ši liekana yra gale įsivaizduojamo iRNR ir genominės grandinės junginio. Lizino liekanos buvimas žmogaus polipeptidinėje grandinėje tikrinamas nustatant žmogaus kDNR klono (kuris gautas iš iRNR), išskirto iš COS-I ląstelių, kurios transformuotos su žmogaus genomine DNR 7 pavyzdyje, infra, seką.

7 LENTELĖ

Žmogaus ir beždžionės polipeptidų EPO palyginimas

	-20	-10	+1	10	20	30	40
Žmogus	MGVHECPAWLWLLSLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRYLERYLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTI	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Beždžionė	MGVHECPAWLWLLSLVSLPLGLPVPGPAPPRLICDSRYLERYLEAKEAENVTMGCSSECSLNENITVPDTI						
Žmogus	50	60	70	80	90	100	110
Beždžionė	VNFYAWKRMEVGQDAVEVWQGLALLSEAVLRGQAVLANSSQPFEPQLHMOKAISGLRSITLLRALGAQ-I						
Žmogus	120	130	140	150	160		
Beždžionė	AISPPDAASAPLRTITADTFRKLFVRVYSNFLRGKLYTGEACRTGOR						
	*****	*****	*****	*****	*****		
	AISLPDAASAPLRTITADTFCKLFRVYSNFLRGKLYTGEACRRCOR						

6 PAVYZDYS

Pirminės mikrobiologinės sintezės bandymuose gauti izoliuotų kiekių polipeptidinę eritropoetino medžiagą, koduojamą beždžionės kDNR, gautos, kaip aprašyta 3 pavyzdyje, būdu, parinkta ekspresijos sistema yra sistema, kurioje yra žinduolio ląstelė-šeimininkė (pvz., COS-I ląstelė, A.T.C.C. Nr.CPL-1650). Nurodytos ląstelės vykdo transfekciją "šaudyklinio" vektoriaus pagalba, kuris turi sugebėjimą spontaniškai replikuotis E.Coli ląstelėje (dėka DNR derivatų iš pBP322 plazmidžių buvimo) ir žinduolių šeimininkuose (dėka DNR derivatų iš virusų SV-40 buvimo).

Konkrečiau, ekspresijos vektorius sudaromas pagal žemiau nurodytas metodikas. 83 plazmidžių klonas, gautas 3-me pvz., amplifikuojamas į E.Coli bakterijas ir, pervirinant EcoRI ir HindIII, izoliuoja apytikriai 1.4 kbeždžionės DNR, koduojančią eritropoetiną. Iš pBR322 plazmidžių atskirai išskirta 4.0 kb fragmento HindIII/SalI. Iš DNR, kurios turi M13mp10 pasikartojimus R-DNR (R ir I laboratorijos) gauta apie 30 porų azotinių bazių (bp) "jungiančios grandies" EcoRI/SalI fragmento. Nurodyta "jungianti grandis" nuosekliai susideda iš EcoRI lipnaus galo, po kurio seka atpažinimo zonos SStI, SmaI, BamHI ir XbaI ir lipnus SalI galas. Trys ankščiau nurodyti fragmentai susiuvami su gautu maždaug 5.4 kb tarpinės plazmidės ("pERs") EPO-DNR, kuris iš vienos pusės ribojamas naudojant naudingų sričių "bloką" ribojantį endonukleozės atpažinimą. Po to PERs plazmidė transformuojama HindIII ir SalI bakterijų, gaunant eritropoetiną iš DNR ir EcoRI į "jungiančią grandį" SalI (M13mp10).

Anksčiau nurodytos 1.4 kb ilgio DNR fragmentas susiuvamas su plazmidės pBP322 BamHI/SalI sritimi, kurios ilgis apie 4.0 kb ir kitomis fragmento M13mp10 HindIII/BamHI "jungiančiomis grandimis". "Jungiančios grandies" M13mp10 fragmentas yra HindIII-lipnusias galas, po kurio seka atpažinimo fragmentai PstI, SalI, XbaI ir BamHI lipnusias galas. Susiuvimo produktu vėl gaunama naudinga tarpinė plazmidė "pBR-EPO" turinti savyje EPO-DNR, kuri iš abiejų pusių ribojama ribojančios zonos "kaupiančiomis eilėmis".

Parinktas EPO-DNR ekspresijai COS-I ("pDSVL1") ląstelėse vektorius pagaminamas iš anksto, tam, kad būtų galima vykdyti E.Coli atranką ir autoduplikaciją. Nurodytos charakteristikos pasiekiamos dėka replikacijos pradžios ir DNR genų sekos, atsparių ampicilino veikimui, kuris yra zonoje vykdančioje pBP322 plazmidės nukleotidų 2448 ir 4362 suartinimą. Nurodyta eilės seka struktūriškai modifikuojama dėka "jungiančių zonų" įvedimo, kurios užtikrina HIndIII atpažinimą iškart kai tik 2448 nukleotidas prisiglaudžia dar nespėjus jam ištraukti nurodytą vektorį. Šalia vektoriaus parinkimo EPO-DNR ekspresijai savybės, prie naudingų savybių priskiriama sugebėjimas autoduplikuotis COS-I ląstelėse ir eiliškumo buvimas, kuris veikia sustiprinančiai virusą žinduolio ląstelėse. Nurodytos charakteristikos pasiekiamos dėka replikacinės DNR eilės pradžios ir "vėlyvojo" DNR geno eiliškumo, kuris yra viruso sustiprintojas, dalyvaujantis grandinėje, susidedančioje iš 342 bazių porų, sutraukiančiu SV40 genomo nukleotidus nuo S170 iki 270. Unikali ribojanti sritis (BamHI) susidaro ant vektoriaus, tuoj pat prigludama prie viruso sustiprintojo eilės dėka sustiprintojo standartinės sekos buvimo naudojant "jungiančios grandies" seką esančią rinkoje (Collaborative Research). Papildomai į vektorių įvesta 23 azotinių porų seka (kaip viruso SV40 nukleotidų skaičiaus nuo 2553 iki 2770 išvestinė) turinti virusinės iRNR "vėlyvojo geno" poliadenilino signalą (paprastai žinomas kaip transkripcijos terminatorius). Nurodytas fragmentas išsidėsto vektoriuje atitinkama tvarka "vėlyvojo geno" viruso sustiprintojo atžvilgiu per unikalią BamHI sritį. Nurodytame vektoriuje atstovaujamas taip pat kitas žinduolio genas, esantis nematerkalinėje padėtyje galimos geno transkripcijos atžvilgiu, kuris išsidėstys nurodytoje unikaloje srityje tarp viruso sustiprintojo eilės ir terminatoriaus. [Nurodytas žinduolio genas turi savyje maždaug 2500 bp dihidrofoliat - reduktazės (DHFR)-pelės minigeno, išskirto iš pMG-I, Gresser plazmidės ir kt., P.N.A.S. (USA), 79, p.6522-6526, 1982m.] Ir vėlgi dauguma veikiančios plazmidės pDSVL1 komponentų susideda iš 2448-4362 nukleotidų iš pBR322 plazmidės kartu su 5/A1-270 (342 bp) ir 2353-2770 (273 bp) nukleotidais viruso DNR, turinčiai SV40 virusą.

Pagal anksčiau aprašytas metodikas, pvz., Maniatis et al., eritropoetinę koduojančią DNR išskiria iš pBP-ERO plazmidės BamHI fragmento pavidalu ir įsiuva į pDSVL1 plazmidę, išpjautą BamHI. Norint įsitikinti, ar teisingai įvestas EPO-genas, dviejuose iš gautų kloninių vektorių (duplikuoti H ir L vektoriai) vykdoma analizė, naudojant ribojantį fragmentą (žiūr. fig.2, iliustruojančią pDSVL1-M_EE plazmidę). Neteisingos orientacijos EPO-genų vektorių palikome kaip neigiamų dydžių reguliatorius transfekcijos eksperimentuose, skirtuose EPO ekspresijos lygio pagalba nustatymui šeimininkuose, kurie transformuojami vektorių su teisinga EPO-DNR orientacija pagalba.

M, L, X, G vektorių sujungiamo DNR nešiklio (pelių kepenų ir blužnies DNR). Transfekcijai naudojamos 60 mm plokštelės, naudojant mikronusodinimo kalcio fosfatu metodus. Dvigubas 60 mm plokšteles transfektavo DNR nešikliu, kaip negatyvių dydžių transformacijos valdymo "imitacija". Po 5 dienų nauja kultūrinė terpė buvo tirta nustatant polipeptidų buvimą, kurie turi imunologines gamtinio eritropoetino savybes.

7 PAVYZDYS

A. Pradinio EPO ekspresijos sistema, naudojant COS-I ląsteles

Parinkti pirminiame etape mikrobiologinės sintezės veikiami izoliuoti polipeptidinio žmogaus eritropoetino kiekiai, koduojami DNR genomo EPO klonų būdu, be to, sistema apima žinduolio ląstelių-šeimininkių požymių ekspresiją (pvz., COS-I ląstelės, A.T.C.C. Nr.CL-1650). Pradžioje žmogaus EPO-geną subklonuoja (suskaldo) į "šaudyklinį" vektorių, kuris turi sugebėjimą autonomiškai replikuotis abiejose šeimininko E.coli (dėka DNR, išvestos iš pBR322 plazmidės) ir COS-I linijos žinduolių ląstelėje (dėka buvimo SV40 viruso viruso-išvestos DNR). "Šaudyklinis vektorius", turintis EPO polipeptidinę medžiagą, susidaro transfektuotose ląstelėse ir ji išskiriama į ląstelinę kultūrinę terpę. Konkrečiau, požymių ekspresijos vektorių kuriamas pagal žemiau nurodytas metodikas. DNR išskirta iš ėriuko hE1 klono, turinčio genominių EPO-geną, pervirinama BamHI ir HindIII ribojančios

endonukleazės pagalba ir izoliuojasi 5.6 DNR-fragmentu, kaip nustatyta, turinčiu pilną EPO geną. Nurodytą DNR fragmentą sumaišo ir susiuvu su bakterijos pVCB plazmide (Bethesda Research Laboratories, Inc.); kuri analogiškai perdirbama, sukuriant tarpinę "puC8-EVE" plazmidę, sukuriant tokiu būdu, tinkamą organinio fragmento šaltinį.

Parinkti EPO-DNR ekspresijai vektoriai COS-I ląstelėje sukuriama iš anksto. pSV4SEt plazmidė, turinti DNR seką, suteikia pasirinkimo ir autoduplikacijos galimybę E.Coli bakterijoje. Nurodytos charakteristikos pasiekiamos dėka replikacijos pradžios ir DNR geno sekos tvarkos, atsparios ampicilinui, kuris yra toje srityje, suartinančioje nukleotidus nuo 2442 iki 4332 pBR322 bakterinės plazmidės. Nurodyta seka keičia struktūrą dėka "jungiančios grandies" įvedimo, kuris aprūpina atpažinimo sritį tuoj pat, kai ji prisiliečia prie 2443 nukleotido. pSV4SEt plazmidė taip pat gali autoduplikuotis COS-I ląstelėse. Nurodytos charakteristikos pasiekiamos dėka 342 bp fragmento panaudojimo, kuris turi viruso replikacijos pradžią SV40 viruso pagalba (nukleotidų skaičius nuo 5171 iki 370). Nurodytas fragmentas modifikuojamas įvedant "jungiančią grandį", kuri aprūpina EcoRI atpažinimo sritį, kuri yra šalia 270 nukleotido ir įvedant "specialią" grandį, aprūpinančią sritį, esančią prie 5171 nukleotido. Šiame vektoriuje yra SV40 viruso 1061 bp fragmentas (nukleotidų skaičius nuo 1711 iki 2772) su papildoma "jungiančia grandimi", kuri aprūpina Sall atpažinimo sritį, esančią prie 2772 nukleotido.

Nurodyto fragmento ribose yra unikali atpažinimo BamHI seka. Apibendrinant tai, kas pasakyta, pV4SEt plazmidė turi savyje unikalias atpažinimo sritis BamHI ir HindIII, kas leidžia įvesti žmogaus EPO geną. Nurodytos sekos suteikia galimybę vykdyti replikaciją ir selektyvų parinkimą E.Coli bakterijoje ir replikaciją COS-I ląstelėse.

Tam, kad įvesti EPO geną į pSV4SEt plazmidę, p40-HuE plazmidė pervirinama BamHI ir HindIII pagalba iki ribojančios endonukleazės ir yra izoliuojami 5,6 kb EPO, koduojančio DNR fragmentą. pSV4SEt plazmidė t.p. pervirinama BamHI ir HindIII pagalba ir pagrindinė fragmento dalis, susidedanti iš 2513 porų bazių, izoliuojama, (išlaikant visas būtinas funkcijas). Nurodyti fragmentai sumaišomi ir susiuvami, sudarydami

galutinį vektorių "pSVgHu EPO" (žiūr. 3 pav.). Šis vektorius skiedžiamas E.Coli ląstelėje, o IIKt vektorius izoliuojamas. Tam, kad įsitikinti, ar įvestas EPO genas, vykdoma ribojančio fermento analizė.

DNR pSVgHu EPO plazmidė naudojama tam, kad išryškinti EPO-polipeptidinės medžiagos požymius COS-I ląstelėse. Detaliai aprašant, DNR pSVgHu EPO plazmidės susijungia su DNR nešikliu ir transportuojama į COS-I ląstelių triplikatines 60 mm plokšteles. DNR nešiklio kontrolei vienas transfektuojamas COS-I ląstelėse.

Ląstelių kultūrinė terpė atrenkama praėjus 5-7 val. ir yra ištiriama dėl polipeptidų buvimo, kurie turi imunologines savybes, būdingas laisvai sutinkamai žmogaus EPO.

B. Antroji EPO požymių ekspresijos sistema COS-I ląstelėse

Dar viena ekspresijos sistema naudojama gauti geresnius žmogaus eritropoetin-polipeptidinės medžiagos produktus, koduojamus žmogaus genomines DNR klonų pagalba, sudaranti EPO COS-I ląstelėse (A.T.C.C. Nr. CRL-1650).

Ankstesnėje sistemoje EPO požymiai COS-I ląstelėse pasireiškia naudojant ten esantį stiprintuvą, kuris yra ribojančio fragmento BamHI srityje, atitinkamai pagal HindIII, ir yra 5,6 kb ilgio. Kitoje struktūroje EPO genas keičiasi gaunant požymių ekspresiją, naudojant vėlyvąjį viruso SV40 stiprintuvą. Konkrečiau, žmogaus genomio EPO ribojantis fragmentas, t.y. klonuotas 5,6 kb BamHI atitinkantis HindIII modifikuojamas pagal šią metodiką. Kaip aprašyta anksčiau, pVC8-HuE plazmidė suskaldoma dalyvaujant BamHI ir ribojančiai endonukleazei BStEII. Ribojanti endonukleazė BStEII suskaldo 5,6 kb ribose EPO geną toje vietoje, kurioje yra 44 poros bazių 5' iki pradinių ATG, koduodama peptidą-pirmtaką ir apytiksliai 680 porų bazių 3' iki ribojančios srities HindIII. Po to atsiskiria fragmentas, kuriame yra apie 4900 porų bazių. DNR fragmentas su sintetine "jungiančia grandimi", kurią sudaro SalI ir BStEII lipnūs galai ir vidinė BamHI atpažinimo sritis, sintezuojama ir išvaloma. Abu nurodyti fragmentai susimaišo ir susijungia su plazmide pB322, kuri iškerpama SalI ir BamHI pagalba, kad gauti tarpinę plazmidę pBRgHe. Žmogaus EPO genominių genų galima iš jos izoliuoti kaip fragmentą BamI

su 4900 porų bazių, kuriame yra pilna geno struktūra su vienetine ATG 44 bp 3' atitinkančią BamHI sritį, kuri yra greta koduotos aminogrupės srities galo.

Gautą fragmentą izoliuoja ir įveda kaip fragmentą BamHI į plazmidę pDSVLI išskaidyto ekspresijos vektoriaus BamHI (žiūr. 6 pavyzdį). Gauta plazmidė pSVLgHu EPO, kaip parodyta fig.4., naudojama išryškinti EPO polipeptidinės medžiagos požymius iš COS-I ląstelių, kaip aprašyta 6 ir 7a pavyzdyje.

8 PAVYZDYS

Kultūrinė terpė, išauginta iš 6 transfektuotų COS-I ląstelių kultūrų 6 pavyzdyje išanalizuota radioimunine analize pagal metodiką, nurodytą 2 pavyzdyje, B dalyje. Kiekvienas pavyzdys buvo analizuojamas esant alikvotinio mėginio reikšmėms 250, 125, 50, 25 mkl. Sluoksniai iš augančių ląstelių "tariamai" transfektuotų vektorių pagalba su neteisinga EPO genų orientacija, turėjo neigiamą imunoreaktyvumo reikšmę. Kiekvienam dviejų skysčio sluoksnių pavyzdžiui, gautam iš COS-I ląstelių, kurios transfektuotos vektoriais (H ir L) su teisinga EPO DNR orientacija, R5I-EPO inhibicijos procentas, sujungto su antikūniu, svyruoja nuo 72 iki 88%, kurie sutalpina visas reikšmes į viršutinę standartinės kreivės dalį. Todėl negalima tiksliai apskaičiuoti tikros eritropoetino koncentracijos plaukiojančiuose kultūros sluoksniuose. Buvo atlikti nedideli apskaičiavimai, lygūs 300 mv/ml, tačiau skaičiavimai buvo atlikti esant pačiam didžiausiam alikvotiniam mėginiui (250 mkl).

Kultūrinio skysčio pavyzdys, gautas pagal 6 pavyzdį ir 5-7 dienų kultūriniai skysčiai, aprašyti pavyzdyje 7a buvo analizuojami radioimunologiniu metodu, kad palyginti beždžionės ir žmogaus rekombinantinių EPO medžiagų aktyvumą su laisvai sutinkamu žmogaus EPO, kuris atitinka standartą. Gauti rezultatai pateikti fig.1 grafike.

Trumpiau tariant, gauti rezultatai netikėtai parodė, kad rekombinantinis beždžionės EPO iš esmės konkuruoja dėl antikūnio, surišto su žmogaus anti-EPO, kurio nepavyko pilnai inhibuoti bandymų metu.

Maksimalus inhibicijos reikšmių procentas žmogaus rekombinantiniam eritropoetinui vis tiek yra artimas standartiniams rodikliams. Dozės-efekto kreivės paralelinis tipas parodo sekų (epitopų) imunologinį identiškumą. Prieš skaičiuojant beždžionės EPO koncentracijas kultūriniuose skysčiuose buvo atlikti pakartotiniai įvertinimai, esant didelėms nurodyto praskiedimo reikšmėms. Buvo nustatyta, kad jos svyruoja intervale nuo 2,91 iki 9,12 V/ml. Suskaičiuoti žmogaus EPO produkcijos lygiai nustatyti atitinkamai 392 V/ml pavyzdyje, kuris buvo kultivuotas 5 dienas ir 567 mV/ml pavyzdyje, kuris buvo kultivuotas 7 dienas. Apskaičiuoti beždžionės EPO produkavimo lygiai 7B pavyzdyje ekspresijos sistemos, buvo analogiški arba geresni.

9 PAVYZDYS

Kultūriniai skysčiai, gauti pagal 6 ir 7 pavyzdį buvo analizuoti in vitro, kad nustatyti EPO aktyvumą pagal Goldwasser et al., Endocrinology, 97, 2 p. 315-313(1975) metodiką. Paskaičiuotos beždžionės EPO reikšmės tiriamuose kultūriniuose skysčiuose svyravo nuo 3,2 iki 4,3 V/ml. Žmogaus EPO kultūriniai skysčiai taip pat buvo aktyvūs gautuose apskaičiavimuose in vitro tyrime ir be to nurodytą aktyvumą galima neutralizuoti veikiant antikūnų anti-EPO. Rekombinantinio beždžionės EPO kultūriniai skysčiai 6 pavyzdyje taip pat buvo tiriami kiekybiniu biologinio aktyvumo nustatymu in vitro, pagal bendrą metodiką Cotes et al., Nature, 191, p. 1065-1067(1967) ir Hammand et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., t. 149, p. 516-527(1968). Nurodyti aktyvumo lygiai svyravo nuo 0,94 iki 1,24 V/ml.

10 PAVYZDYS

Ankstesniuose pavyzdžiuose rekombinantinio žmogaus arba beždžionės EPO medžiaga gaunama iš vektorių, kurie naudojami transfektuoti COS-I ląstelėms. Nurodyti vektoriai atlieka replikaciją COS-I ląstelėse dėl viruso SV40 T antigeno buvimo

ląstelės viduje, prasidedant replikacijai nurodytuose vektoriuose.

Nors gauti vektoriai atgamina gerąsias EPO savybes COS-I ląstelėse, šios savybės yra laikinos (7-14 dienų) dėl galimo vektoriaus praradimo. Be to tik nedidelis procentas atgamintų COS-I tampa produktyviai transfektuotomis nurodytais vektoriais. Šis pavyzdys aprašo požymių ekspresijos sistemas, naudojančias kinietiško žiurkėno kiaušidės DHFR ląsteles (CHO) ir selektuojamą markerį, DHFR.

Giminingų ekspresijos sistemų apsvarstymą rasite JAV patente Nr. 4.399.216 ir paraiškoje išduoti Europatentui Nr. 117058 1/7059 ir 117060, išleistuose rugpjūčio 29d. 1984 metais.

CHO DHFR ląstelėse (Dux-B11) CHO KI, Urlaub et al., Proc. Nat. Acad. Sci.(JAV), t.77, p. 4461(1980) dėl mutacijų, kurios vyksta struktūriniuose genuose, trūksta enzim-dihidrofoliat-reduktazės (DHFR), ir todėl būtinas glicinas, hipoksantinas ir timidinas kultūrinėje terpėje.

Plazmidės pDSVL-MKE (6 pavyzdys) pDSLV-gH₄EPO (7B pavyzdys) transfektuojamos kartu su DNR nešikliu į DHFR CHO ląsteles, kurias išaugina terpėje, turinčioje hipoksantino, timidino ir glicino 60 mm kultūrinės plokštės. Plazmidę pSVgH₄EPO (7a pavyzdys) sumaišo su plazmide pMG₂, kurioje yra pelės genas dihidrofoliat-reduktazės pagrindu, klonuotas į vektorių bakterinės plazmidės pRR 322 (pagal Gasser et al., Supra). Plazmidžių ir DNR nešiklių mišinį transfekuoja į DNR-CHO ląsteles (ląstelės, kurios paima vieną plazmidę, paprastai taip pat paims ir antrą plazmidę). Po 3 dienų gautos ląstelės disperguojamos tripsinizavimo būdu keliose 100 mm kultūrinės plokštelėse, terpėje, kurioje trūksta hipoksantino ir timidino. Tiksliai tos ląstelės, kurios transformuojasi į stabilią būseną, veikiant genui DHFR, parodo EPO geno išlikimą toje terpėje. Po 7-21 dienos tampa matomos gyvų ląstelių kolonijos. Nurodytos transformantų kolonijos po dispergavimo tripsinizavimo būdu gali nenutrūkstamai daugintis terpėje, kurioje trūksta hipoksantino ir timidino, sukurdamos naujus ląstelių kamienus (pvz., CHO pDSVL-MKEPO, CHO pSVgH₄EPO, CHO pDSVL-9B₄EPO).

Kultūriniai skysčiai, gauti iš aukščiau minėtų ląstelių kamienų, tiriami radioimuniniu metodu, ieškant beždžionės ar žmogaus rekombinantinio EPO. Terpė kamienams CHO pDSVL-MKEPO turi EPO su tokiomis pat imuninėmis savybėmis, kaip ir EPO, gautas iš ląstelių COS-I, transfektuotų plazmide pDSVL-MKEPO. 65 valandų kultūrinio skysčio pavyzdys turi beždžionės EPO 0,6 v/ml.

Kultūriniai skysčiai, gauti iš CHO pSVgH₄EPO ir CHO pDSVL-gH₄EPO, turi rekombinantinį žmogaus EPO, kuris pasižymi tokiais pat imunologinėmis savybėmis, kaip ir EPO, gautas iš ląstelių COS-I, transfektuotų plazmide pSVgH₄EPO arba pDSVL-gH₄EPO. 3 dienų kultūrinio skysčio pavyzdys, gautas iš CHO pSVgH₄EPO, turi 2,99 v/ml žmogaus EPO, o pavyzdys, išlaikytas 5,5 dienas, gautas iš CHO pDSVL-gH₄EPO, turi 18,2 V/ml žmogaus EPO, kaip rodo radioimuninės analizės rezultatai.

EPO kokybę, gautą iš aukščiau minėtų, galima padidinti sustiprinant genus, sukuriant naujus ląstelių kamienus, kurių efektyvumas būtų didesnis. Fermentas dihidrofoliatreduktazė (DHFR), kuri yra DHFR geno koduojamas produktas, gali būti inhibuota metotreksatu (MTX). Ląstelės, kurios dauginasi terpėje, kurioje nepakanka hipoksantino ir timidino, inhibuojamos arba užmušamos metotreksatu. Tam tikrose sąlygose (pvz., esant minimaliai metotreksato koncentracijai) galima gauti ląstelių atsparumą ir jų galimybę augti metotreksate (MTX). Nustatyta, kad nurodytos ląstelės tampa atsparios MTX dėl to, kad sustiprėja eilė jų DHFR genų, dėl to padidėja fermento produkcija. Gyvas ląsteles, savo ruožtu, galima apdoroti padidintomis metotreksato koncentracijomis, ko pasekoje ląstelių kamienuose padidės DHFR genų kiekis. "Prabėgantys genai" (pvz. EPO) pernešami ekspresijos vektoriaus kartu su DHFR genu arba transformuojami su juo, kaip dažnai nustatoma, padidina savo reprodukcijų skaičių.

Amplifikacinės sistemos praktinės realizacijos pavyzdys yra ląstelių CHO pDSVL-MKE kamienas, apdorotas metotreksatu didinant jo koncentraciją (0 nM, 30 nM, 100 nM). Pavyzdžiai, kultivuoti 65 valandas kiekviename amplifikacijos etape, radioimuninės analizės duomenimis turi eritropoetino, kurio kiekiai yra atitinkamai 0,60, 2,45 ir 6,10 V/ml. CHO pDSVL-9H₄EPO ląstelių kamienai apdorojami metotreksatu, didinant jo koncentraciją

serijose: 30 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 1 mkM ir 5 mkM. Pavyzdys, kuriame yra 3 dienų viršnuosėdinis skystis jį apdorojant 100 nM metotreksato (MTX) koncentracija radioimuninio tyrimo duomenimis turi žmogaus eritropoetino 3089 ± 129 V/ml. Pavyzdžiai, kuriuose buvo 48 valandų kultūrinė terpė, apdoroti metotreksatu, kurio koncentracija 100 nM ir 1 mkM turi žmogaus eritropoetino radioimuninės analizės duomenimis atitinkamai 466 ir 1352 V/ml (tai vidutinė reikšmė gauta 3 kartus tiriant pavyzdžius). Pagal nurodytą metodiką 60 mm Petri lėkštelėje, kurioje yra 5 ml terpės išsėjama po 1×10^6 ląstelių. Po 24 valandų terpė pašalinama ir pakeičiama nauja terpe (5 ml), kurioje nėra serumo DMEM su dideliu gliukozės kiekiu į kurią papildomai pridedama 0,1 M ne pagrindinių amino rūgščių ir L-glutamino. Eritropoetinas kaupiasi 48 valandas terpėje, kurioje nėra serumo. Po to terpė tirinama radioimuniniu metodu, o ląstelės tripsinizuojamos ir po to suskaičiuojamos. Vidutinės eritropoetino reikšmės pavyzdžiuose tiriant radioimuniniu metodu yra apie 467 ir 1352 V/ml ląstelėms, išaugintoms apdorojant 100 nM ir 1 mkM metotreksato koncentracijomis. Faktinis eritropoetino kiekis Petri lėkštelėje buvo 2335 ir 6750 V. Vidutinis ląstelių kiekis lėkštelėje buvo atitinkamai 1.94×10^6 ir 3.12×10^6 .

Tokiu būdu, efektyvaus produkavimo greitis nurodytose sąlygose turi reikšmes 1264 ir 2167 V/ 10^6 ląstelių per 48 valandas.

Anksčiau aprašytos ląstelių kultūros yra genetiškai įvairi produkcija. Tam, kad izoliuoti genetiškai negyvus klonus, kurie turi didžiausias produkcijos galimybes, naudojami standartiniai atrinkimo metodai. (žiūr. A skyrių, 2 dalį "Points to Consider in Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologics", liepos 1d. 1984 m., JAV biopreparatų mokslinio patikrinimo skyrius, vaistinių preparatų ir biopreparatų centras, maisto produktų ir vaistų valdyba).

Anksčiau aprašytas CHO ląstelių linijų, produkuojančių eritropoetiną, produktyvumas gali būti padidintas naudojant atitinkamas ląstelių kultivavimo metodikas. Žinduolių ląstelių dauginimuisi kultūrinėje terpėje paprastai reikalingas serumas. Eritropoetino gavimo iš CHO ląstelių terpėje, kurioje nėra serumo būdas palengvina eritropoetino rektifikaciją iš

kultūrinės terpės. Žemiau aprašytu būdu galima gauti didelius eritropoetino kiekius terpėje be serumo, kurių pakanka gamybai.

CHO pDSVL-gH₄EPO linijas ląstelės, išaugintos standartinėse ląstelių kultivavimo sąlygose, pasėliui naudojami flakonai su pasėjama ląsteline kultūra. Nurodytos ląstelės dauginasi flakonuose kaip suspensinė ląstelinė linija, kurioje yra persėta ląstelių kultūra, terpėje, kuri sudaryta 50:50 DHEM su dideliu gliukozės kiekiu ir F12Ham, į kurią pridėta 5% karvės embriono serumo, L-glutamino, penicilino, streptomicino 0,05 mM nepagrindinių aminorūgščių ir atitinkamos koncentracijos metotreksato mišinio.

Suspensijos pavidalo ląstelinėse kultūrose yra galimybė greitai daugintis eritropoetinui, kuris gaunamas iš CHO ląstelių. CHO ląstelės, kurios auginamos suspensijos pavidalu, naudojamos ląstelėms pasėti į besisukančius indus. Pirminis pasėlio tankis $1,5 \cdot 10^7$ gyvybingų ląstelių 850 cm^2 nurodyto indo, kuriame yra 200 ml terpės.

3 dienas nurodytos ląstelės auginamos iki monosluoksniu susidarymo, santykinai tankiai prisišliejusią ląstelių linijų. Naudojama šioje fazėje ląstelių auginimo terpė yra analogiška terpei, kuri naudojama ląstelių kultivavimui suspensijoje. 3 dienų ląstelių augimo periodo pabaigoje terpę, kurioje yra serumas, atskiria ir pakeičia ją į 100 ml terpę, kurioje nėra serumo. Šioje terpėje yra 50:50 mišinys DHEM su dideliu gliukozės kiekiu ir F12Ham, į kurią papildomai pridėta 0,05 mM nepagrindinių aminorūgščių ir L-glutaminas. Besisukančius indus su paruošta terpe patalpina 2-3 valandoms į inkubatorių. Po to terpę pašalinama ir pakeičiama į 100 ml naujos, neturinčios serumo terpės. Po 1-3 valandų inkubacijos terpėje be serumo sumažėja baltymų užteršimo serumu koncentracija. Po to besisukančius indus vėl patalpina 7 dienoms į inkubatorių. Tuo periodu kultūrinėje terpėje be serumo kaupiasi eritropoetinas. Po to senoji terpė pašalinama ir pakeičiama į naują, neturinčią serumo terpę, kuri yra reikalinga antram produkavimo ciklui. Praktinis nurodytos sistemos realizavimo pavyzdys, laikytas 7 dienas terpėje be serumo, radioimuninio tyrimo duomenimis turėjo 3892-409 V/ml eritropoetino. Atsižvelgiant į ląstelių tankio paskaičiavimus apie $0,9-1,8 \cdot 10^5$ ląstelių cm^2 , kiekviename besisukančiame inde, kurio

plotas 850 cm^2 yra nuo 0,75 iki $1,5 \cdot 10^8$ ląstelių. Tada eritropoetino produkcijos greitis per 7 dienas 100 ml kultūros yra ribose tarp 750 ir $1470 \text{ V}/10^6$ ląstelių per 48 valandas.

Viršnusėdiminiai skysčiai iš ląstelinės linijos CHO pDSVL-MKEPO, amplifikuoti metotreksate esant 10 nM koncentracijai buvo tirti radioimuniniu metodu bandant eritropoetino aktyvumą in vitro ir in vivo. Ištirtas radioimuniniu metodu pavyzdys, pagamintas koncentruotoje terpėje turi $41,2 \pm 1,4 \text{ V/ml}$ eritropoetino; $41,2 \pm 0,064 \text{ V/ml}$ nustatytas biologinis aktyvumas in vitro, o $42,5 \pm 5 \text{ V/ml}$ tiriant biologinį aktyvumą in vivo. Nustatant aminorūgščių liekanų polipeptidinių produktų sekas, aptinkama eritropoetininų produktų, kurių dominantinis tipas turi 3 liekanas "pirmaujančios" sekos, kuri prijungiama prie numanomų aminogrupių, kurios baigiasi alaninu. Šiuo metu neaišku ar tai yra CHO ląstelių polipeptido branduolio neteisingo apdorojimo rezultatas, ar tai žmogaus ir beždžionės eritropoetinių struktūros skirtumai aminogrupių pabaigose.

Viršnusėdiminį skystį, paruoštą iš CHO ląstelių linijos pDSVL-gH₄EPO tyrė 3 bandymais. Radioimunitinio tyrimo duomenimis $5,5 \text{ V/ml}$ rekombinantinio žmogaus eritropoetino tyrime in vitro - $15,8 \pm 4,6 \text{ V/ml}$, tyrime in vivo $16,8 \pm 3,0 \text{ V/ml}$.

Paruoštą iš CHO ląstelių linijos pDSVL-gH₄EPO ir laipsniškai amplifikuojamą 100 nM metotreksatu tyrė 3 bandymais. Radioimunitinės analizės duomenimis 3 dienų pavyzdys turi $3089 \pm 129 \text{ V/ml}$ rekombinantinio žmogaus eritropoetino; tyrime in vitro - $2589 \pm 71,5 \text{ V/ml}$, o tyrime in vivo - $2040 \pm 160 \text{ V/ml}$. Aminorūgščių seka demonstruoja atitikimą 4 lentelėje pateiktiems duomenims.

Kondicionuotą ląstelinę terpę, paruoštą iš CHO ląstelių ir transfektuotą plazmide pDSV-MKE 10 nM metotreksate, sujungia ir metotreksatą dializuoja kelių dienų bėgyje, ko pasėkoje susidaro kultūra su eritropoetino aktyvumu maždaug $221 \pm 5,1 \text{ V/ml}$ (eritropoetinas - kondicionuota ląstelių terpė) (EPO-CCM). EPO-CCM poveikio paprastos dalelės hematokritui linijoje Balb/c įvertinimui atliktas toks eksperimentas. Kondicionuotą ląstelinę terpę, paruoštą iš netransfektuotų CHO(CCM) ląstelių ir EPO-CCM reguliuoja naudojant standartinį buferinį tirpalą retikulocitams (PB). Kondicionuotą ląstelinę

terpę panaudoja kontrolinei gyvūnų grupei (3 pelytės), o eksperimentinėms grupėms (2 pelytės grupei) naudoja 2 EPO-CCM dozavimo lygius: 4 vienetai injekcijai ir 44 vienetai injekcijai. 5 savaičių kurso bėgyje 7 pelytėms po 3 kartus savaitėje suleidžiamos injekcijos į pilvą. Buvo nustatyta, kad kontrolinėje grupėje po 8-tos injekcijos vidutiniai hematokrito rodikliai buvo 50,5%, 4 vienetams EPO-CCM gaunančioje grupėje 55,1%, o 44 vienetams -67,9%.

Gana grynus žinduolių ląstelių ekspresijos produktus be sunkumų galima išskirti iš kultūrinės terpės naudojant HPLC(C₄) su etaloniniu gradientu, pageidautina esant pH7.

Atliktas išankstinis mėginimas nustatyti rekombinantinių glikoproteininių produktų, gautų iš kondicionuotos COS-I ląstelių ir eritropoetino (iš žmogaus šlapimo) CHO geno ekspresijos terpės, savybes, naudojant tiek Western blot (nuspalvinimo), tiek ir SDS-PAGE analizes. Minėti tyrimai parodė, jog eritropoetininė medžiaga, gaminama CHO ląstelių, turi šiek tiek didesnę molekulinę masę, nei COS-I ląstelių ekspresijos produktai, kurių savo ruožtu, truputį didesnė, nei žmogaus šlapimo ekstrakto. Tam tikru laipsniu visi produktai yra heterogeniški. Sialo rūgšties pašalinimui panaudotas fermentas - neiraminidazė sukelia tai, jog rekombinantiniai ląstelių COS-I ir CHO produktai turi maždaug vienodą molekulinę masę, ir kurios (tiek viena, tiek ir kita) yra didesnės nei žmogaus šlapimo ekstrakto, turinčio azialo grupes, molekulinę masę. Apdorojimas fermentu - endoglikozidaze (EC 3.2.1) CHO ląstelių rekombinantinį produktą bei šlapimo ekstrakto produktą (pilnam angliavandenių pašalinimui) įgalina gauti beveik homogeniškus produktus, kurių molekulinės masės beveik vienodos.

Išgrynintą eritropoetiną, gautą iš žmogaus šlapimo, bei rekombinantinį, gautą iš CHO ląstelių, eritropoetiną pagal šį išradimą, analizuoja ieškodami angliavandeninės sudėties pagal metodiką (Zedden et al., Methods in Enzymology, t.83, p.139-191(1982)), kuri modifikuota, panaudojant hidrolizės metodą, aprašytą Nesser et al., Anal. Biochem., t.142, p.58-67(1984). Eksperimentiškai nustatyti šlapimo izoliato angliavandeninės sudėties rodikliai (išreikšti moliniais santykiais) yra šie: heksozė - 1.73, acetilgliukozaminas - 1, neizamininės rūgšties acetilas - 0.93, fukozė - 0, acetilgalaktozaminas - 0.

Atitinkami rekombinantinių produktų (ląstelių linijos CHO pDVSL-gH ir EPO darinių) rodikliai (po 3 dienų kultūrinėje terpėje, sustiprintoje 100 nM metotreksatu) turi šias reikšmes: heksozė - 15.09, N-acetilgliukozaminas - 1, neizamininės rūgšties acetilas - 0.998, fukozė - 0, N-acetilgalaktozaminas - 0. Gauti rezultatai sutampa su anksčiau minėtų analizių (Western blot ir SDS-PAGE) rezultatais.

Glikoproteininių produktų, gautų pagal šį išradimą, pirminė struktūrinė konformacija pakankamu lygiu atkartoja laisvai sutinkamo eritropoetino konformaciją, kad įgytų vieną ar daugiau jo biologinių savybių, tačiau jų angliavandenių kiekybinė sudėtis skirtinga.

11 PAVYZDYS

Siūlomas pavyzdys apima visą eritropoetino gavimo ciklą, montuojant nukleotidines dviejų struktūrinių genų, koduojančių žmogaus eritropoetino seką bazes, pateiktų 6 lentelėje ir turinčių požymių ekspresijos kodonus E.Coli ir mielinėse ląstelėse (S.Cerevisial).

Šiame pavyzdyje papildomai aprašyta genų, koduojančių eritropetino analogus, konstrukcija. Trumpiau kalbant, naudoti protokolai pateikti anksčiau minėtame aprašyme Alton et al. (WO 83/04053). Minėti genai sukonstruoti pirminiam sudėtingo diploido oligonukleotidų dedamųjų montavimui, kurie savo ruožtu sumontuoti trijose diskretiškose sekcijose (blokuose). Šie blokai sumontuoti amplifikacijai, o pašalinant iš amplifikacijos sistemos gali būti sumontuoti nuosekliai arba per sudėtingos struktūros fragmentą- ligatūrą į tinkamą ekspresijos vektorius.

8-14 lentelėse parodyta schema ir konstravimas geno, koduojančio eritropoetino transliacijos produktą, kuriame nėra jokios prieš tai einančios sekos ar sekos-lyderio, tačiau yra pradinis metionino likutis padėtyje - 1. Dar daugiau, įvestas į pagrindinę ląstelės E.Coli dalį genas teikia pirmenybę kodonams, o minėta konstrukcija vadinama "ECEPO" genu.

1 dalies ECEPO oligonukleotidai

1. AATTCTAGAAACCATGAGGGTAATAAAATA
2. CCATTATTTTATTACCCTCATGGTTTCTAG
- 5 3. ATGGCTCCGCCGCGTCTGATCTGCGAC
4. CTCGAGTCGCAGATCAGACGCCGGCGGAG
5. TCGAGAGTTCTGGAACGTTACCTGCTG
6. CTTCAGCAGGTAACGTTCCAGAACT
7. GAAGCTAAAGAAGCTGAAAACATC
- 10 8. GTGGTGATGTTTTAGCTTCTTTAG
9. ACCACTGGTTGTGCTGAACACTGTTC
10. CAAAGAACAGTGTTTCAGCACAACCA
11. TTTGAACGAAAACATTACGGTACCG
12. GATCCGGTACCGTAATGTTTTCGTT

15

9 LENTELEECEPO 1 dalis

XbaI
EcoRI 1 3
 AATTCTAG AAACGATGAG GGTAATAAAA TAATGGCTCC GCCGCGTCTG
 GATC TTTGGTACTC CCATTATTT ATTACGAGG CGGCGCAGAC 4

20

5
 ATCTGCGACT CGAGAGTCT GGAACGTTAC CTGCTGGAAG CTAAAGAAGC
 TAGACGCTGA GCTCTCAAGA CCTTGCAATG GACGACCTTG GATTCTTTCG 6

7 9 11
 TGAAAACATC ACCACTGGTT GTGCTGAACA CTGTTCTTTG AACGAAAACA
 ACTTTTGTAG TGGTGACCA CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCTTTTGT 8 10

25

KpnI BamHI
 TTACGGTACC G
 AATGCCATGG CCTAG
 12

2 dalies ECEPO oligonukleotidai

1. AATTCGGTACCAGACACCAAGGT
2. GTTAACCTTGGTGTCTGGTACCG
- 5 3. TAACTTCTACGCTTGGAAACGTAT
4. TTCCATACGTTTCCAAGCGTAGAA
5. GGAAGTTGGTCAACAAGCAGTTGAAGT
6. CCAAACCTCAACTGCTTGTGACCAAC
7. TTGGCAGGGTCTGGCACTGCTGAGCG
- 10 8. GCCTCGCTCAGCAGTGCCAGACCCTG
9. AGGCTGTACTGCGTGGCCAGGCA
10. GCAGTGCCTGGCCACGCAGTACA
11. CTGCTGGTAAACTCCTCTCAGCCGT
12. TTCCCACGGCTGAGAGGAGTTTACCA
- 15 13. GGAACCGCTGCAGCTGCATGTTGAC
14. GCTTTGTCAACATGCAGCTGCAGCGG
15. AAAGCAGTATCTGGCCTGAGATCTG
16. GATCCAGATCTCAGGCCAGATACT

11 LENTELE

2 dalies ECEPO

EcoRI KpnI
A ATTGGGTACC AGACACCAAG GTAACTTCT ACGCTTGGAA ACGTATGGAA
 GCCAIGG TGTGGGTTC CAATTGAGA TCGGAACCTT TGCATACCTT

5 GTTGGTCAAC AAGCAGTTGA AGTTGGCAG GTCTGGCAC TGCTGAGCGA
 CAACCAAGTTG TTGTCAACT TCAAACTGTC CCAGACCGTG ACGACTCGCT

9 GGCTGTACTG CGTGGCCAGG CACTGCTGGT AAATCCTCT CAGCCGTGGG
 CCGCAATGAC GCACCGGTCC GTGACCGACCA TTGAGGAGA GTGGGACCC

13 AACCGCTGCA GCTGCATGTT GACAAAGCAG TATCTGGCCT GAGATCTG
 TTGGCGACGT CGACGTACAA CTGTTTCGTC ATAGACCGGA CTCTAGACCTAC

BglII BamHI

12 LENTELEECEPO 3 dalis

1. GATCCAGATCTCTGACTACTCTGC
5 2. ACGCAGCAGAGTAGTCAGAGATCTG
3. TGCGTGCTCTGGGTGCACAGAAAGAGG
4. GATAGCCTCTTTCTGTGCACCCAGAGC
5. CTATCTCTCCGCCGGATGCTGCATCT
6. CAGCAGATGCAGCATCCGGCGGAGA
10 7. GCTGCACCGCTGCGTACCATCACTG
8. ATCAGCAGTGATGGTACGCAGCGGTG
9. CTGATACCTTCCGCAAACGTGTTTCG
10. ATACACGAAACAGTTTGCGGAAGGT
11. TGTATACTCTAACTTCCTGCGTGGTA
15 12. CAGTTTACCACGCAGGAAGTTAGAGT
13. AACTGAAACTGTATACTGGCGAAGC
14. GGCATGCTTCGCCAGTATACAGTTT
15. ATGCCGTACTGGTGACCGCTAATAG
16. TCGACTATTAGCGGTCACCAGTAC

20

25

13 LENTELEECEPO 3 dalis

BamHI BglII
 GA TCCAGATCTCTG
 GTCTAGAGAC

5

ACTACTCTGC ¹ TCGGTGCTCT ³ GGGTGCACAG AAAGAGGCTA ⁵ TCTCTCCGCC
 TGATGAGACG ² ACGCAGGAGA ⁴ CCCACGTGTC TTTCTCCGAT AGAGAGGCGG

10

GGATGCTGCA TCTCTCTGCAC ⁷ CGCTGCGTAC CATCACTGCT ⁹ GATACCTTCC
 CCTACGACGT ⁶ AGACGACGTG ⁸ GCGACGCATG GTAGTGACGA CTATGGAAGG

GCAAACTGTT TCGTGTATAC ¹¹ TCTAACTTCC TCGGTGGTA ¹³ ACTGAACTG
 CGTTTGACAA ¹⁰ AGCACATA ¹² AGATIGAAGG ACGCACCATT TGACTTTGAC

15

TATACTGGCG AAGCCTGCGG ¹⁵ TACTGGTGAC ^{SalI} CGCTAATAG
 ATATGACCGC ¹⁴ TTCGTACGGC ¹⁶ ATGACCACTG GCGATTATC AGCT

20

25

14 LENTELEECEPO Genas

-1 1
MetAla

XbaI

CTAG AAACCATGAG GGTAATAAAA TAATGGCTCC GCCGCGTCTG
TTTGGTACTC CCATTATTTT ATTACCGAGG CGGCGCAGAC

5 ATCTGCGACT CGAGAGTTCT GGAACGTTAC CTGCTGGAAG CTAAAGAAGC
TAGACGCTGA GCTCTCAAGA CCTTGCAATG GACGACCTTC GATTTCCTCG

TGAAAACATC ACCACTGGTT GTGCTGAACA CTGTTCTTTG AACGAAAACA
ACTTTTGTAG TGGTGACCAA CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCTTTTGT

10 TTACGGTACC AGACACOAAG GTTAACTTCT ACGCTTGGA ACGTATGGAA
AATGCCATGG TCTGTGTTTC CAATTGAAGA TGCGAACCTT TGCATACCTT

GTTGGTCAAC AAGCAGTTGA AGTTTGGCAG GGTCTGGCAC TGCTGAGCGA
CAACCAGTTG TTCGTCAACT TCAAACCGTC CCAGACCGTG ACGACTCGCT

GGCTGTACTG CGTGGCCAGG CACTGCTGGT AACTCCTCT CAGCCGTGGG
CCGACATGAC GCACCGGTCC GTGACGACCA TTTGAGGAGA GTCGGCACCC

15 AACCGCTGCA GCTGCATGTT GACAAAGCAG TATCTGGCCT GAGATCTCTG
TTGGCGACGT CGACGTACAA CTGTTTCGTC ATAGACCGGA CTCTAGAGAC

ACTACTCIGC TGCGTGCTCT GGGTGCACAG AAAGAGGCTA TCTCTCCGCC
TGATGAGACG ACGCACGAGA CCCACGTGTC TTTCTCCGAT AGAGAGGCCG

20 GGATGCTGCA TCTGCTGCAC CGCTGCGTAC CATCACTGCT GATACCTTCC
CCTACGACGT AGACGACGTG GCGACGCATG GTAGTGACGA CTATGGAAGG

GCAAACTGTT TCGTGTATAC TCTAACTTCC TGCGTGGTAA ACTGAAACTG
CGTTTGACAA AGCACATATG AGATTGAAGG ACGCACCATT TGACTTTGAC

SalI

TATACTGGCG AAGCATGCCG TACTGGTGAC CGCTAATAG
ATATGACCGC TTCGTACGGC ATGACCACTG GCGATTATCA GCT

25

Tiksliau 8 lentelė iliustruoja oligonukleotidų panaudojimą ECEPO geno galinės liekanos I-mos dalies, koduojančios galinės žmogaus polipeptido liekanas, generavimui. Oligonukleotidai sujungiami po du (1 ir 2, 3 ir 4 ir t.t.), kuriuos vėliau susiuvu ta, kad gautų I ECEPO dalį, kaip 9 lentelėje. Reikia pažymėti, kad surinkta dalis turi EcoRI ir BamIII lipnieji galūnių galai, be to pagal lipnaus galo EcoRI "srovę" nukreipta ribojančio fermento XbaI atpažinimo sritis, o prieš lipnaus galo BamII "srovę" nukreipta KpnI atpažinimo sritis.

I dalį galima lengvai amplikuoti, naudojant fago MI3 fagą, naudojamą dalies eiliškumui patikrinti. Kai kurių sunkumų netikėtai kyla išskiriant dalį fragmento XbaIKpnI iš DNRPF, generuojamo E.Coli, tikriausiai, dėl atpažinimo srities KpnI bazių metilinimo šeimininko zonoje. Todėl DNR fagą izoliuoja ir atgamina dvispiralinėje formoje in vitro pradmens prailginimo būdu ir po to izoliuoja reikiamą dvispiralinį fragmentą.

2 ir 3-čia ECEPO geno dalys (9 ir 13 lentelės) sukuriamos tokiu pat būdu iš oligonukleotidų atitinkamai 10 ir 12 lentelėse. Kiekvieną dalį amplifikuoja MI3 vektoriuje, kuris naudojamas sekos patikrinimui ir išskiria iš DNR fago. Kaip aišku iš 11 lentelės, 2-ra ECEPO dalis sudaroma su lipniais galais BamIII ir SalI ir gali būti išskirta iš DNR PF kaip BglIII/SalI fragmentas. Tokiu būdu gautas tris dalis galima lengvai surinkti į DNR pirminę seką (14 lentelė), koduojančią pilną žmogaus EPO polipeptidą su metionino galūnės kodonu (ATG) inicijuoti transliacinei E.Coli pradžiai. Reikia pažymėti, kad prieš pirminės ATG "srovę" nukreipta eilė azoto bazių, pakankamai duplikuojančių fragmento seką surišančios ribosomos stipriai išreikšto OMP-f geno E.Coli.

ECEPO pernešimui galima panaudoti bet kokį tinkamą ekspresijos vektorių. Specifinis vektorius ECEPO geno ekspresijai kaip jautri temperatūrai plazmidė pCFM536 yra plazmidės pCFM414 [A.T.C.C. 40076] - kaip aprašyta tuo pačiu laiku peržiūrime paraiškoje JAV patentui 636727, pateiktoje 1984m. rugpjūčio 6d.

Konkrečiau - pCFM536 skaido su XbaI ir HindIII; didelį fragmentą izoliuoja ir naudoja dvipusiam susiuvimui su genu ECEPO. Dalis I/XbaI/KpnI/, 2/KpnI/Bgl/ ir 3/BglIII/SalI/

preliminariai surenka teisinga tvarka į MI3 ir EPO geną išskiria iš ten kaip atskirą fragmentą XbaI/HindIII. Į šį fragmentą įjungia dalį polisurišančios grandies iš MI3 Mp9-fago, sutraukiančio jame fragmentus SalI ir HindIII. Ekspresijos kontrolė gautoje ekspresijos plazmidėje, p536, vykdo pagalba promotoriaus liambda P_L, kuris pats gali kontroliuoti represeriniu genu C₁₈₅₇ (tokiu, kaip tas, kuris gautas KI2 Htrp grandinės E.Coli).

Pagamintas ECEPO genas gali būti modifikuotas įvairiais metodais eritropoetino analogų, tokių, kaip aukščiau aprašyti, [AS_n²,des-Pro² pagal Ile⁶]hEPO ir [His⁷]hEPO kodavimui.

A. [AS_n²,des-Pro² pagal Ile⁶]hEPO

Plazmidė 536, nešanti pagamintą ECEPO geną, lentelė XIV, kaip intarpą XbaI į HindIII skaido su HindIII ir XhoI. Pastarojo endonukleazė perpjauna ECEPO geną universaliame atpažinimo fragmente, turinčiame 6 poras azoto bazių, sutraukdama paskutinę kodono bazę, koduojančią Asp³, su antra kodono baze Arg¹⁰. Statoma "surišančios grandies" seka XbaI/XhoI, turinti tokią seką:

		+1	2	7	8	
XbaI	Me	Ala	Asn	Cys	Asp	
5'-CTAG	ATG	GCT	AAT	TGC	GAC-3	XhoI
8'	-TAC	CGA	TTA	ACG	CTG	AGCT-5

Surišančią grandį XbaI/XhoI ir geno ECEPO fragmentą XhoI/HindIII įstato į didelį fragmentą, gautą skaidant XbaI ir HindIII plazmidės pCFM526 - plazmidės pCFM414 (A.T.C.C. 40076) darinio - kaip aprašyta tuo pačiu metu peržiūrime paraiškoje JAV patentui Nr.636727, pateiktai 1984m. rugpjūčio 6d. Charles P.Morris, generavimui plazmidės, nešančios DNR seką, koduojančią E.Coli ekspresiją, Met⁻¹ norimo analogo formos.

B. [His⁷]hEPO

Plazmidę 536 skaido su HindIII ir XbaI, kaip A dalyje. Surišanti grandis XbaI/XhaI pagaminta tokia seka:

XbaI		+1	2	3	4	5	6	7	8	9
XhoI										
		Me	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ala	His	Asp
5'	-CTAG	ATG	GCT	CCG	CCA	CGT	CTG	ATC	CAT	GAC-3
8'		TAC	CGA	GCC	GGT	GCA	GAC	AG	GTA	CGT
	AGCT-5									

Surišančią grandį ir ECEPO sekos fragmentą XhoI/HindIII po to įterpia į pCFM plazmidę nešančios DNR generacijai, koduojančiai ekspresiją E.Coli formos Met⁻¹ pageidaujamo analogo.

Ekspresija geno ("SCEPO"), turinčio savyje mielių dominantinius kodonus, vyksta, kaip aprašyta lentelėse XV-XXI. Taip pat kaip ir geno ECEPO atveju, pilna struktūra turi trijų rinkinių oligonukleotidų darinių (lentelės 15, 17 ir 19), kurie sudaro dupleksus ir susirinko į sekcijas (lentelės 16, 18 ir 20). Reikia pažymėti, kad sintezė iš dalies palengvinama, panaudojant kai kuriuos suboptimalius kodonus abejose EPO ir ECEPO struktūrose, t.y. oligonukleotidai 7-12 I sekcijos abiems genams buvo identiškos, taip pat, kaip buvo identiškai 1-6 2 sekcijos oligonukleotidai kiekviename gene.

15 LENTELE1 dalies SCEPO oligonukleotidai

1. AATTCAAGCTTGGATAAAAGAGCT
 5 2. GTGGAGCTCTTTTATCCAAGCTTG
 3. CCACCAAGATTGATCTGTGACTC
 4. TCTCGAGTCACAGATCAATCTTG
 5. GAGAGTTTTGGAAAGATACTTGTIG
 6. CTTCACAAGTATCTTTCCAAAAC
 10 7. GAAGCTAAAGAAGCTGAAAACATC
 8. GTGGTGATGTTTTACGCTTCTTTAG
 9. ACCACTGGTTGTGCTGAACACTGTTC
 10. CAAAGAACAGTGTTACGCACAACCA
 11. TTTGAACGAAAACATTACGGTACCG
 15 12. GATCCGGTACCGTAATGTTTTCGTT

16 LENTELESCEPO 1. dalis

EcoRI HindIII 1
 20 AATTCA AGCTTGGATA
 GT TCGAACCTAT
 2

AAAGAGCTTC ACCAAGATTG ATCTGTGACT CAGAGTTTT
 TTTCTCGAGG TGTTTCTAAC TAGACACTGA GCTCTCAAAA
 4

5 7
 25 GGAAAGATAC TTGTGGAAG CTAAAGAAGC TGAAAACATC ACCACTGGTT
 CCTTCTATG AACAACCTTC GATTCTTCG ACTTTTGTAG TGGTGACCAA
 6 8

9 11 KpnI BamHI
 GTGCTGAACA CTGTTCCTTG AACGAAAACA TTACGGTACC G
 CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCCTTTGT AATGCCATGG CCTAG
 12

17 LENTELE2 dalies SCEPO oligonukleotidai

1. AATTCGGTACCAGACACCAAGGT
- 5 2. GTTAACCTTGGTGTCTGGTACCG
3. TAACTTCTACGCTTGGAACGTAT
4. TTCCATACGTTTCCAAGCGTAGAA
5. GGAAGTTGGTCAACAAGCAGTTGAAGT
6. CCAAACCTCAACTGCTTGTTGACCAAC
- 10 7. TTGGCAAGGTTTGGCCTTGTTATCTG
8. GCTTCAGATAACAAGGCCAAACCTTG
9. AAGCTGTTTTGAGAGGTCAAGCCT
10. AACAAGGCTTGACCTCTCAAAACA
11. TGTTGGTTAACTCTTCTCAACCATGGG
- 15 12. TGGTTCCCATGGT.TGAGAAGAGTTAACC
13. AACCATTGCAATTGCACGTGAT
14. CTTTATCGACGTGCAATTGCAA
15. AAAGCCGTCTCTGGTTTGAGATCTG
16. GATCCAGATCTCAAACCAGAGACGG

20

25

18 LENTELESCEPO 2 dalis

EcoRI 1 KpnI
 5 A ATTCCGGTACC AGACACCAAG
 GCCATGG TCTGTGGTTC
2

GTTAACTTCT 3 ACGCTTGGAA ACGTATCGAA GTTGGTCAAC 5 AAGCTGTTGA
 CAATTGAGAGA TCGGAACCTT TGCATACCTT CAACCAGTTG 6 TTCGACAACT
4

10 AGTCTGGCAA 7 GGTTTGGCCT TGTATCTGA 9 AGCTGTTTGT AGAGGTCAAG
 TCAAACCGTT CCAAACCGGA ACAATAGACT TCGACAAAAC 10 TCTCCAGTTC
8

CCTTGTGGT 11 TAACTCTTCT CAACCATGGG 13 ACCATTGCA ATTGCACGTC
 GGAACAACCA ATTGAGAAGA GTTGGTACCC TTGGTAACGT TAACGTGCAG 14
12

15 GATTAAGCCG 15 TCTCTGGTTT BglII BamHI GAGATCTG
 CTATTTCTGGC AGAGACCAAA CTCTAGACCTA G
16

20

25

19 LENTELE3 dalies SCEPO oligonukleotidai

1. GATCCAGATCTTTGACTACTTTGTT
5. 2. TCTCAACAAAGTAGTCAAAGATCTG
3. GAGAGCTTTGGGTGCTCAAAAGGAAG
4. ATGGCTTCCTTTTGAGCACCCAAAGC
5. CCATTTCCCCACCAGACGCTGCTT
6. GCAGAAGCAGCGTCTGGTGGGGAA
- 10 7. CTGCCGCTCCATTGAGAACCATC
8. CAGTGATGGTTCTCAATGGAGCG
9. ACTGCTGATACCTTCAGAAAGTT
10. GAATAACTTTCTGAAGGTATCAG
11. ATTCAGAGTTTACTCCAATTCT
- 15 12. CTCAAGAAGTTGGAGTAACTCT
13. TGAGAGGTAAATTGAAGTTGTACAC
14. ACCGGTGTACAACTTCAATTTACCT
15. CGGTGAAGCCTGTAGAACTGGT
16. CTGTCACCAGTTCTACAGGCTTC
- 20 17. GACAGATAAGCCCGACTGATAA
18. GTTGTTATCAGTCGGGCTTAT
19. CAACAGTGTAGATGTAACAAAG
20. TCGACTTTGTTACATCTACACT

20 LENTELE

SCEPO 3 dalis

BamHI BolII 1
 GATC CAGATCTTTG ACTACTTTGT TGAGAGCTTT
 GTCTAGAAAC TGATGAAACA ACTCTGAAA

5

3 5
 GGGTGCTCAA AAGGAAGCCA TTTCCCCACC AGACGCTGCT TCTGCCGCTC
 CCCACGAGTT TTTCTTCGGT AAGGGGTGG TCTGCGACGA AGACGGCGAG
4 6

7 9 11
 CATTGAGAAC CATCACTGCT GATACCTTCA GAAAGTTATT CAGAGTTTAC
 GTAACCTTTG GTAGTGACGA CTATGGAAGT CTTTCAATAA GCTCAAATG
8 10 12

10

13 15
 TCCAACCTTCT TGAGAGGTAA ATTGAAGTTG TACACGGGTG AAGCCTGTAG
 AGGTTGAAGA ACTCTCCATT TAACCTCAAC ATGTGGCCAC TTCGGACATC
14 16

17 19
 AACTGGTAC AGATAAGCCC GACTGATAAC AACAGTGTAG
 TTGACCACTG TCTATTTCGGG CTGACTATTG TTGTCACATC
18

15

SalI

ATGTAACAAA G
 TACATTGTTT CAGCT
20

20

25

21 LENTELESCEPO genas

-1 +1

HindIII ArgAla

AGCTTGGATA AAAGAGCTCC ACCAAGATTG ATCTGTGACT CGAGAGTTTT
 ACCTAT/ TTTCTCGAGG TGGTICTAAC TAGACACTGA GCTCTCAAAA

5. GGAAAGATAC TTGTTGGAAG CTAAAGAAGC TGAAAACATC ACCACTGGTT
 CCTTTCTATG AACAACCTTC GATTICTTCG ACTTTTGTAG TGGTGACCAA

GTGCTGAACA CTGTTCTTTG AACGAAAACA TTACGGTACC AGACACCAAG
 CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCTTTTGT AATGCCATGG TCTGTGGTTC

10 GTTAACTTCT ACGCTTGGAA ACGTATGGAA GTTGGTCAAC AAGCTGTTGA
 CAATTGAAGA TCGGAACCTT TGCATACCTT CAACCAGTTG TTCGACAACT

AGTTTGGCAA GGTTTGGCCT TGTTATCTGA AGCTGTTTTG AGAGGTCAAG
 TCAAACCGTT CCAAACCGGA ACAATAGACT TCGACAAAAC TCTCCAGTTC

CCTTGTGGT TAACTCTTCT CAACCATGGG AACCATTGCA ATTGCACGTC
 GGAACAACCA ATTGAGAAGA GTTGGTACCC TTGGTAACGT TAACGTGCAG

15 GATAAAGCCG TCTCTGGTTT GAGATCTTTG ACTACTTTGT TGAGAGCTTT
 CTATTTCCGC AGAGACCAAA CTCTAGAAAC TGATGAAACA ACTCTCGAAA

GGGTGCTCAA AAGGAAGCCA TTTCCCCACC AGACGCTGCT TCTGCCGCTC
 CCCACGAGTT TTCCTTCGGT AAAGGGGTGG TCTGCGACGA AGACGGCGAG

20 CATTGAGAAC CATCACTGCT GATACCTTCA GAAAGTTATT CAGAGTTTAC
 GTAACCTCTG GTAGTGACGA CTATGGAAGT CTTTCAATAA GTCTCAAATG

TCCAACCTCT TGAGAGGTAA ATTGAAGTTG TACACCGGTG AAGCCTGTAG
 AGGTTGAAGA ACTCTCCATT TAACTTCAAC' ATGTGGCCAC TTCGGACATC

AACTGGTGAC AGATAAGCCC GACTGATAAC AACAGTGTAG
 TTGACCACTG TCTATTCGGG CTGACTATTG TTGTCACATC

25 ATGTAACAAA G SalI
 TACATTGTTT CAGCT

Surinktos sekcijos SCEPO eina į MI3 ir 1, 2 ir 3 sekcijos išsiskiria iš fago HindIII/KpnI/BglII ir BglII/SalI.

Pirmenybine dabar ekspresijos sistema geno SCEPO produktams yra ekspresijos sistema S.Cerevisial α -faktorius pagrindu, kaip aprašyta tuo pat metu esančioje peržiūroje paraiškoje JAV patentui Nr.487753, pristatytoje 1983m. balandžio 22d. Crant A.Bitter, atspausdintoje 1984m. spalio 31d. kaip paraiška Europos patentui 0123294. Trumpiau tariant, sistema turi savyje konstrukciją, kur DNR, koduojanti mielių α -faktorius geno vedančiąją seką, išsidėsto iš karto 5' išreiškiamo ekzogeninio geno koduojančios srities atžvilgiu. To pasėkoje transliuojamas genų produktas turi vedančią arba signalinę seką, kuri "apdorojama" mielių endogeniniu fragmentu likusios produkto dalies sekrecijos kryptimi. Kadangi konstrukcija duoda galimybę panaudoti kodoną inicijuojantį α -faktorius (ATG) transliaciją, nereikėjo sukurti tokį kodoną SCEPO geno padėtyje -1. Kaip galima padaryti išvadą iš lentelės 21, alaninas (+1), koduojantis seką, stovi po surišančios grandies sekos, kas leidžia atlikti betarpišką intarpą į plazmidę, turinčią DNR pirmiems 80-čiai likučių α -faktorius pradinės sekos, sekančios po α -faktorius promotoriaus. Specifinė dominuojanti struktūra CEPO geno ekspresijai turi keturpusį susiuvimą, įskaitant aukščiau nurodytą sekcijos CEPO fragmentą ir didelį skaidymo fragmentą HindIII/SalI plazmidės p C3. Iš gaunamos plazmidinės p C3/SCEPO išskiria α -faktorius promotorinę ir lyderinę sekas, o taip pat SCEPO geną, kaitinant su BamIII ir susiuvu skaidymo būdu gautą plazmidinę pYE BamHI, susidarant plazmidinei pYE/SCEPO ekspresijai.

12 PAVYZDYS

Šis pavyzdys priklauso ekspresijai rekombinantinių produktų, pagamintų ECEPO ir SCEPO - genų, 11 pavyzdžio ekspresijos sistemos ribose.

Naudojant ekspresijos sistemą, apskaičiuoja panaudojimui šeimininko E.Coli ląstelėse. 11 pavyzdžio plazmą p536 transformuoja ląstelėse E.Coli AM7, anksčiau transformuotas su tinkama plazmide pMWI, priėmusia į save geną C₁₈₅₇. Ląstelių

kultūros buljone (50 mkg/ml ampicilino, 5 mkg/ml kanamicino, geriau su 10 mM MgSO₄) laiko 28 °C temperatūroje ir ląstelių augimo periode kultūroje iki O.D₆₀₀ = 0,1, EPO ekspresiją indukuoja, pakeliant temperatūrą iki 42 °C. Ląstelės auga apytikriai iki 40 O.D., sudarydamos sąlygas EPO gavimui (įvertinta geliu) apie 5 mg/OD 1.

Ląsteles surenka, lizuoja, susmulkina prancūzišku presu (10000 psi) ir apdoroja lizicinu ir detergentu NP-40. Centrifuguojant (24000g) gautas nuosėdas ištirpina guanidino Hcl ir toliau vykdo vienkartinį valymą su C₄ (Vydac) atvirkščių fazių HPLC (EtOH, 0-80 %, 50 mM NH₄Ac, pH 4,5). Baltymų bazių sekos nustatymas parodo, kad produktas švaresnis nei 95 %, o gauti produktai turi du skirtingus NH₂-galus, A-P-P-R..... ir P-P-R....., esant kiekybiniam santykiui 3:1. Šis pastarasis hEPO ir [de-ala]hEPO produktų stebėjimas reiškia, kad amino galų "apdorojimas" šeimininko ląstelėse tarnauja pašalinimui galinio metionino, o kai kuriais atvejais, pradinio alanino. Radioimuniniais tyrimais nustatytas izoliatų aktyvumas yra 150000-160000 V/mg lygyje; in vitro nustatytas aktyvumas yra 30000-62000 V/mg; ir in vitro nustatytas aktyvumas kinta 120-720 V/mg ribose (sulyginta su žmogaus šlapimo izoliato standartu, lygiu 70000 V/mg kiekvienam bandymui). Kreivė dozė-efektas rekombinantiniam produktui, atliekant bandymą in vitro, žymiai skiriasi nuo žmogaus šlapimo EPO standarto kreivės.

EPO-analogo plazmidės, padarytos 11 pavyzdžio A ir B dalyse, kiekviena transformuojama į pMWI-transformuotos ląstelės E.coli AM7 ir ląstelės kultivuojamos, kaip aprašyta aukščiau. Išvalytus izoliatų tiria kaip RIA, taip ir in vitro. Reikšmės, gautos tiriant RIA ir in vitro [Asn², de-Pro pagal Ile⁶]hEPO produktų ekspresijai sudaro atitinkamai apytikriai 11000 V/mg ir 6000 V/mg baltymo, tuo tarpu [His⁷]hEPO analizės reikšmės sudaro 41000 V/mg baltymo. Tai reiškia, kad analogų produktai yra "aktyvūs" 1/4 - 1/10 taip pat kaip "gimdytojo" ekspresijos produktų tyrimuose.

Ekspresijos sistemoje, skirtoje panaudoti šeimininko S.Cerevisial ląstelėse, pYE/SCEPO plazmidę transformuoja į du skirtingus kamienus, YSDP4 (αpep4-3trpI genotipas)/ ir PK81

genotipas $\Delta\Delta$ pep4-3trp^I). Transformuoti šeimininkai YSDP4 auginami terpėje SD (mielių genetikos metodai, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 62 psl.(1983) vykdomoje casamino rūgštimis 0,5%, pH6,5, 30⁰ C temperatūroje. Terpės, surinktos, kai ląstelės išauga iki 36 O.D. turi produktų EPO maždaug 244 V/ml/97 mkg/ODl lygyje, kas išaiškinama naudojant RIA). Transformuotos ląstelės RK8I, išaugintos iki 6,5 O.D. arba 60 O.D., sudaro terpes su EPO koncentracija apie 80-90 V/ml/34 mkg/O.Dl, kas išaiškinta RIA/. Preliminariniai tyrimai nustato žymų heterogeniškumą produktuose, gautuose naudojant ekspresijos sistemas, kas, tikriausiai, nulemta pakitimais ekspresuotų baltymų glikozidiniame, o taip pat palyginus aukšta prijungto angliavandenio koncentracija.

Plazmidės P Δ C3 ir pYE ląstelėse E.Coli HB10I buvo pateiktos registracijai pagal JAV Patentų reikalų žinybos taisyklės nuo 27 rugsėjo 1984m. Amerikos tipinių kultūrų kolekcijos, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland depozitinis numeris A.T.C.C. 39881 ir A.T.C.C.39882 atitinkamai. Plazmidės pCFM526 ląstelėse MI03 ir pMWI ląstelėse MI03 buvo užregistruotos panašiu būdu 21 lapkričio 1984m., kaip A.T.C.C. 33932, 33934 ir 33933 atitinkamai. Kamienai YSPDA ir RK8I Saecharomyces Cerevisial buvo užregistruoti 21 lapkričio 1984m., kaip A.T.C.C. 20734 ir 20733 atitinkamai.

Iš aukščiau pateiktų iliustracinių pavyzdžių turėtų būti aišku, kad šis išradimas daugeliu aspektų siūlo ypač vertingus produktus ir būdus.

Siūlomi polipeptidai yra aiškiai naudinga medžiaga ar tai būtų mikrobiniu ar sintetiniu būdu gauti produktai, kurių pirminė, antrinė ir tretinė konformacijos tapo pirmą kartą žinoma šio išradimo dėka.

Kaip anksčiau buvo pašymėta, rekombinantiškai gaminami ir sintetiniai išradimo produktai skiria nevienodu laipsniu iš natūralių šaltinių EPO izoliatų aktyvumą in vitro ir todėl projektuojami tam, kad tikėtų kaip EPO izoliatų pakaitalai kultūrinėse terpėse, naudojamose eritropoetino ląstelių auginimui kultūroje. Taip pat, kadangi šio išradimo polipeptidiniai produktai skiria natūralių EPO izoliatų aktyvumą in vivo jie gali būti tinkami eritropoetino terapijos

metodikoje, naudojamoje žinduoliams, įskaitant žmogų, gavimui bet kurio ar visų efektų, būdingų EPO in vivo, pavyzdžiui, retikulocitų atsakymo stimuliavimui, ferokinetinių efektų išvystymui (tokių, kaip geležies apykaita plazmoje ir perėjimo į smegenų medžiagą laiko efektas), eritrocitų masės mainų, hemoglobino C sintezės stimuliavimas (žiūr. Eschlach et al., Supra) ir, kaip pažymėta 10 pavyzdyje, hematokrito lygio padidėjimas žinduoliuose. Į grupę žmonių, gaunančių siūlomus produktus, įeina pacientai, kaip taisyklė tie, kuriems reikalingas kraujo perpylimas, įskaitant traumų aukas, chirurginius ligonius, inkstų ligonius, įskaitant dializuojamus ligonius, pacientus su kraujo sudėties ypatybe, iššaukiančia sutrikimus, tokius kaip hemofilija, fiziologinė anemiazė ir panašios. Kraujo perpylimo būtinumo minimizacija terapijoje eritropoetino terapijos panaudojimo dėka, galima laukti, sumažins infekcinės ligos sukėlėjo pernešimą. Rekombinantiniu būdu gauti siūlomi produktai, reikia manyti, neturi pirogenų, natūralių slopinančių produktų, ir todėl be abejonės turi užtikinti padidintą bendrą efektą terapijos metuose, palyginus su gamtiniais produktais. Eritropoetino terapija, naudojant siūlomus produktus, turėtų būti naudinga, pakeliant individualų deguonies pralaidumo sugebėjimą, palyginus su hipoksinėmis išorinės aplinkos sąlygomis ir, gal būt, užtikrinant palankius širdies kraujagyslių efektus.

Siūlomų polipeptidinių produktų geriausias įvedimo būdas yra parenteralinis (pavyzdžiui, į veną, į raumenis, į poodį ar į pilvą), ir įvedamos kompozicijos turi, kaip įprasta, turėti terapiškai efektyvų produkto kiekį derinyje su tinkamais skiedikliais, nešikliais ar stimulatoriais. Preliminarūs farmakokinetiniai tyrimai pažymi ilgesnį skilimo pusperiodį in vivo beždžionės EPO produktams, leidžiant juos į raumenis, negu į veną. Kaip spėjama, efektyvios dozės gali žymiai keistis priklausomai nuo sąlygų, tačiau terapinės dozės, kaip laukiama, gali svyruoti nuo 0,1-7 iki 100-7000 V/mkg aktyvios medžiagos kilogramui kūno svorio. Standartiniai skiedikliai, tokie kaip plazminis žmogaus albuminas, numatomas farmacinėse šio išradimo kompozicijose greta standartinių nešiklių, tokių kaip fiziologinis tirpalas.

Siūlomose kompozicijose tinkamos stimuliuojančios medžiagos turi junginių, savarankiškai nurodytų eritropoetiniams

stimuliuojantiems efektams, kaip pvz., testosteronas, ląstelių pirmtakų stimulatoriai, augimo faktorius insulino tipo, prostoglandinai, serotoninas, ciklinis AMΦ prolaktinas ir trijodtironinas, o taip pat priemonės, paprastai naudojamos aplastinės anemijos gydymui, tokios kaip metendenas, stanozolas ir nandrelonas [žiūr., pvz., Resegott et al., Panminerva Medica, 23, 243-248 (1981); McGonigle et al., Kidney Int, 26/2, 437-444 (1984); Pavlovic-Kantera et al., Exp. Hematol., 8 supp., 283-291 (1980); Kurtz, FEBS Letters, 14a/I/, 105-108 (1982)]. Kaip stimulatorius taip pat numatoma naudoti medžiagas, sustiprinančias arba sinergizuojančias eritropoetino arba asialo EPO veikimą, pavyzdžiui, adrenerginiai antagonistai, tiroidiniai hormonai, adrogeniniai ir BPA [žiūr. Dunn "Current Concepts in Erythropoiesis", John Willy & Sons / Chichester, England, 1983; Weiland et al., Blut, 44(3), 173-175 (1982); Kalmanti, Kidney Int, 22, 383-391 (1982); Shahid, New Eng. J. Med., 289, 72-80 (1973); Fischer et al., Steroids, 30(6), 833-845 (1977); Urabe et al., J.Exp. Med., 149, 1614-1325 (1979) ir Billat et al., Exp. Hematol., 10(1), 133-140 (1982)], o taip pat klasės junginių, žymimų kaip hepatiniai, eritropoetiniai faktoriai [žiūr. Naughton et al., Acta Haemat., 69, 171-179 (1983)] ir "eritrotropiniai" [kaip aprašyta Congote et al., žurnale Abstract 364, Proceedings 7th International Congress of Endocrinology (Qebec City, Qebec, 1984 m. liepos 1-7 d.; Congate, Biochem. Biophys. Res. Commun., 115(2), 447-483 (1983) ir Congate, Anal. Biochem., 140, 428-433 (1984)] ir "eritrogeniniai" [kaip aprašyta darbe Rothman et al., J. Surg. Oncol., 20, 105-108 (1982)]. Preliminarus skryningas, skirtas eritropoetinių atsakymų išmatavimui ekshipoksinių policiteminių pelių, iš anksto apdorotų arba 5- α -dihidrotesteronu arba pandrodonu, o po to siūlomu eritropoetinu, davė abejotinus rezultatus.

Siūlomų polipeptidų panaudojimas diagnostikai taip pat yra platus, ir įskaitant žymėtų ir nežymėtų formų panaudojimą imuninių tyrimų metodikų įvairovėje, įskaitant RIA, ELISA ir panašiai, o taip pat įvairovėje analizių, atliekamų norint išryškinti aktyvumą in vitro ir in vivo. Žiūr., pvz., Dum et al., Exp. Hematol., 11(7), 649-660 (1983); Gibson et al., Pathology, 16, 155-156 (1984); Krystal, Exp. Hematol., 11(7), 649-660 (1983); Saito et al., Jap. J. Med., 23(1), 61-71 (1984);

Nathan et al., New Eng. J. Med., 308(9), 520-522 (1983); ir įvairios nuorodų medžiagos, turinčios ryšį su paminėtais šiuose darbuose tyrimais. Siūlomi polipeptidai, įskaitant sintetinius peptidus, kurie turi pirmą kartą išryškinto EPO liekanų sekas, taip pat turi ypatingai vertingų grynų medžiagų gamybai polikloninių antikūnų ir monokloninių antikūnų blokų, specifinių nepertraukiamiems ir pertraukiamiems EPO epitopams. Kaip vienas pavyzdys, preliminariniai VI lentelės aminorūgščių sekos tyrimai, sutinkamai su Hopp et al., P.N.A.S. (USA), 78, 3824-3828 (1981) ir antrinių struktūrų sutinkamai su Chon et al., Ann. Rev. Biochem., 47, 251 (1978) išaiškino, kad sintetiniai peptidai, duplikuojantys nepertraukiamas liekanų sekas, sutraukiančias 41-57 padėtis imtinai, 116-118 imtinai ir 144-166 imtinai, tikriausiai turi produkuoti ypač antigeninę reakciją ir gaminti naudingus monokloninius ir polikloninius antikūnus, imunoreaktyvius kaip su sintetiniu peptidu, taip ir su visu baltymu. Tokios medžiagos, kaip tikimasi, turėtų būti naudingos aptinkant ir giminingai valant EPO ir su juo surištus produktus.

Iliustracijai imti trys sintetiniai peptidai:

- (1) hEPO, 41-57 V-P-D-T-K-N-F-Y-A-W-K-R-M-E-V-G;
- (2) hEPO, 116-128 K-E-A-I-S-P-P-D-A-A-S-A-A;
- (3) hEPO, 144-166 V-Y-S-N-F-L-R-G-K-L-K-L-Y-T-G-E-A-C-R-T-G-D-R.

Preliminarūs imunizacijos tyrimai, naudojant aukščiau nurodytus polipeptidus, parodė palyginti silpną teigiamą reakciją į hEPO 41-57, neišmatuojamą reakciją į hEPO 116-128 ir stiprią teigiamą reakciją į hEPO 144-166, kaip nustatyta triušio serumo antikūnų sugebėjimu imunonusodinti žmogaus šlapimo EPO, žymėto ^{125}I , izoliatu. Preliminarūs aktyvumo in vivo tyrimai, atlikti su trimis peptidais, neparodė žymaus aktyvumo nei atskirai, nei kombinacijose.

Nežiūrint į tai, kad įvestos žinduolių EPO aminorūgščių sekos, pateiktos iliustraciniuose pavyzdžiuose, iš esmės nustato pirminę subrendusio EPO konformaciją, reikia suprasti, kad 5 lentelėje pateikta specifinė beždžionės EPO 165 aminorūgščių liekanų seka ir 6 lentelėje pateikta žmogaus EPO 165 aminorūgščių liekanų, neapriboja naudingų polipeptidų, siūlomų išradėjų, kiekio. Šis išradimas apima tas įvairias laisvai sutinkamas alelines EPO formas, kurios praeityje įėjo į biologiškai aktyvių žinduolių polipeptidų tyrimus, kaip, pavyzdžiui,

žmogaus interferonas. (Palyginkite, pavyzdžiui, žmogaus imuninį interferoną, turintį arginino liekaną 140 EPO padėtyje, apie kurį buvo pranešama paskelbtoje paraiškoje patentui Nr.0077670 ir turintys glutaminą padėtyje Nr.140, kaip pranešta darbe Gray et al., Nature, 295, 503-508(1982). Abi rūšys skiriasi tuo, kad sudaro sekas "subrendusio" žmogaus γ -interferono).

Subrendusio EPO alelinės formos gali skirtis viena nuo kitos ir nuo sekų, pateiktų 5 ir 6 lentelėje pagal ilgį ir seką ir/arba pagal delecijas, pakaitus, intarpus ar amino rūgščių priedus į seką greta su logiškai sekančiomis variacijomis pagal sugebėjimą glikozidintis. Kaip anksčiau buvo pažymėta, žmogaus EPO alelinė forma, atrodo, turi turėti metionino liekaną 126 padėtyje. Spėjama, kad laisvai sutinkamos alelinės formos DNR sekų ir EPO - koduojančios genomines DNR, tikriausiai, taip pat gali pasitaikyti, be to, aukščiau nurodyti aleliniai polipeptidų tipai koduojančiais ar paprastai naudojančiais skiriasi kodonai skirti susidarymui tokių pačių polipeptidų, kurie nurodyti.

Prie laisvai sutinkamų subrendusio EPO alelinių formų, šis išradimas taip pat turi kitų "EPO produktų", tokių kaip EPO polipeptidų analogai ir subrendusio EPO fragmentai. Pagal anksčiau paminėtą ir spaudoje paskelbtą paraišką patentui Alton et al., /WO/83/04053/, galima nesunkiai išskaičiuoti ir pagaminti genus, koduojančius mikrobinę ekspresiją polipeptidų, turinčių pirminę konformaciją, kuri skiriasi nuo konformacijos, čia nurodytos subrendusiam EPO identiškumo ir vieno ar daugiau liekanų padėties atžvilgiu (pavyzdžiui, pakaitų galiniai ar tarpiniai priedai ir delecijos). Ir dar, DNR modifikacijos ir genominių EPO genų gali būti lengvai įgyvendinti gerai žinomų sait-nukreiptų mutagenezės metodikų ir naudojami EPO analogų ir jo darinių generavimui. Tokie EPO produktai turi turėti bent jau vieną iš biologinių EPO savybių, bet gali skirtis kitomis. Kaip pavyzdžiai, šio išradimo projektuojami EPO produktai apima tuos, kurie sutrumpinti keliu, pvz., delecijų [ASn², des-Pro² iki Ile⁶]hEPO, [des-Thr¹⁶³ iki Arg¹⁶⁶]hEPO ir "27-55hEPO", be to pastaroji turi likučių, koduojamų išbrauktu visu egzonu; arba kurie atsparesni hidrolizei (ir, to pasekoje, gali turėti stipriau išreikštą ar ilgiau trunkantį poveikį, negu laisvai

sutinkamas EPO); arba kurie buvo pakeisti išbraukiant vieną ar daugiau potencialių sričių glikozidiniui (kuris gali suteikti didelį aktyvumą mielių gaminamiems produktams); arba, kurie turi vieną ar daugiau cisteino liekanų, išbrauktų arba pakeistų, pavyzdžiui, histidinu arba serinu (kaip, pavyzdžiui, [His⁷]hEPO analogas), ir potencialiai lengviau išsiskiria aktyvioj formoj iš mikrobinės sistemos; arba kurie turi vieną ar daugiau tirozino, pakeisto fenilalaninu likučių (kaip, pvz., [Phe¹⁵]hEPO, [Phe⁴⁹]hEPO, [Phe¹⁴⁵]hEPO analogai) ir gali daugiau ar mažiau lengvai jungtis su EPO receptoriais ant planinių ląstelių. Taip pat apimti polipeptidų fragmentai, duplikuojantieji tik dalį nepertraukiamos amino rūgščių sekos arba antrinių konformacijų subrendusio EPO ribose, be to fragmentai gali turėti vieną EPO aktyvumą (pavyzdžiui, eritropoetinis aktyvumas). Ypač svarbūs šia prasme tie EPO potencialiniai fragmentai, kurie paaiškinti apžvelgiant žmogaus DNR genomines sekas, pateiktas 6 lentelėje, t.y. "fragmentai" pilnos nepertraukiamos EPO sekos, kuri apibrėžta introninėmis sekomis ir kuri gali sudaryti ryškiai išreikštus biologinio aktyvumo "domenus". Reikia atkreipti dėmesį, kad aktyvumo nebuvimas in vivo bet kuriam vienam ar daugiau "EPO produktų", pateiktų šiame išradime, apskritai nekenkia terapiniam naudingumui (žiūr., Weiland et al., Supra) ar naudingumui kituose kontekstuose, tokiuose kaip EPO-bandymai ar EPO-antagonizmas. Eritropoetino antagonistai gali būti labai veiksmingi gydant policetemiazę ar EPO perprodukcijos atvejais [žiūr., pvz., Adamson, Hosp.Practice, 18/12/, 49-57(1983) ir Hellman et al., Clin.Lab.Haemat., 5, 335-342(1983)].

Kita šio išradimo ypatybė yra ta, kad čia aprašytos klonuotos DNR sekos, kurios koduoja žmogaus ir beždžionės EPO polipeptidus, yra vertingos informacijai, kurią jie siūlo žinduolių eritropoetino aminorūgščių sekos, kurios anksčiau nebuvo prieinamos, nepaisant dešimtmečius vykdyto laisvai sutinkamų produktų izoliatų analitinio apdorojimo atžvilgiu. DNR sekos taip pat labai vertingos kaip produktai, tinkami stambiai mikrobinei eritropoetino sintezei, naudojant įvairias rekombinantines metodikas. Be to, siūlomoms DNR sekoms naudingos, gaminant naujus ir tinkamus vektorius virusinei ir žiedinei plazmidinei DNR, naujų ir naudingų transformuotų ir

transfektuotų mikrobinių prokariotinio ir eukariotinio šeimininko ląstelių (įskaitant bakterijų ir mielių ląsteles, bei žinduolių ląsteles, išaugintas kultūroje), o taip pat nauji tinkami būdai kultivuojamo tokių mikrobinių šeimininko ląstelių, galinčių užtikrinti EPO ir EPO produktų ekspresiją. Siūlomo išradimo DNR sekos taip pat yra gana tinkama medžiaga naudoti kaip žymėtus zondus izoliavimui EPO ir su juo surišto baltymo, koduojančio DNR sekas ir žinduolių DNR genomines, kitokias, negu beždžionės ir žmogaus, čia iliustruojamas specifiškai.

DNR sekų panaudojimo laipsnio įvairiuose baltymų sintezės būduose (pavyzdžiui, vabzdžių ląstelėse) arba genetinei žmonių ar kitų žinduolių terapijai dar negalima nustatyti. Siūlomos DNR sekos, kaip laukiama, turi būti naudingos išvedant transgenines žinduolių rūšis, kurie gali tarnauti kaip eukariotiniai "šeimininkai" eritropoetino produktų gavimui dideliais kiekiais. Žiūrėkite, pirmiausia, darbą: Palmiter et al., Science, 222/4625/ 803-814(1983).

Čia išnagrinėti konkretūs paaiškinamieji pavyzdžiai, be abejo, neapriboja šio išradimo apimtys, ir specialistai matys daugybę kitimų ir modifikacijų. Nors DNR sekos turi paaiškinamuosius pavyzdžius, vienu pavyzdžiu apima DNR ir genomines DNR sekas, kadangi duota paraiška pateikia informaciją apie aminorūgščių seką, svarbią DNR sekos sudarymui. Išradimas taip pat numato pagaminimą tokios DNR sekos, kurią galima pagaminti remiantis žiniomis apie EPO aminorūgščių seką. Jie gali koduoti EPO (kaip 12 pavyzdyje) o taip pat EPO fragmentus ir EPO polipeptidinius analogus (t.y. "EPO produktus"), kurie gali turėti vieną ar daugiau laisvai sutinkamų EPO biologinių savybių, tačiau neturi kitų (ar turi kitų įvairiu laipsniu).

DNR sekos, siūlomos šiame išradime, tokiu būdu turi apimti visas DNR sekas, tinkamas panaudoti ekspresijai prokarioto ir eukarioto šeimininko ląstelėje polipeptidinio produkto, turinčio, kraštutiniu atveju, dalį pirminės struktūrinės konformacijos struktūros ir viena ar daugiau eritropoetino biologinių savybių ir atrenkamos iš: a) DNR-sekų, pateiktų 5 ir 6 lentelėse; b) DNR sekų, kurios hibridizuoja į DNR sekas, apibrėžtas (a) ar jų fragmentus; c) DNR sekų, kurios dėl genetinio kodo degeneracijos turi

hibridizuotis į DNR sekas, apibrėžtas (a) ir (b). Todėl, dėmesio verta tai, kad žmogaus ir beždžionės alelinio EPO genų sekos ir kitų žinduolių genų sekos, kaip laukiama, turi hibridizuotis į sekas, nurodytas 5 ir 6 lentelėse ar jų fragmentus. Be to dėl genetinio kodo degeneracijos genai CEPO ir ECEPO ir pagamintos ar mutavusios sekos į kDNR ar genominę DNR, koduojančios įvairius EPO fragmentus ir jo analogus, turi taip pat hibridizuotis į anksčiau minėtas DNR sekas. Tokias hibridizacijas galima nesunkiai įvykdyti čia aprašytose sąlygose dėl DNR pirminės izoliacijos, koduojančios žmogaus ir beždžionės DNR ar griežtesnėse sąlygose, jei norima sumažinti fono hibridizaciją.

Nors anksčiau pateikti pavyzdžiai iliustruoja išradimą EPO produktų mikrobinės ekspresijos kontekste žinduolių DNR ekspresijos, įstatytos į hibridinius vektorius bakterinių plazmidinių ir genominių rūšių virusų, panašiai išradime yra pateiktos įvairesnės sistemų ekspresijos. Ypač atkreiptas dėmesys į ekspresijos sistemas, turinčias genominių rūšių vektorius, priklausančius įvairovei bakterinių, mielių ir žinduolių ląstelių kultūroje, o taip pat į ekspresijos sistemas, neturinčias vektorių (pavyzdžiui, ląstelių transfekcija kalcio fosfatu). Todėl bus aišku, kad ekspresijos, pavyzdžiui, beždžionės DNR ląstelėse šeimininko beždžionės kultūroje ir ląstelėse šeimininko žmogaus kultūroje iš tikrųjų sudaro DNR "egzogeninės" ekspresijos pavyzdį, kadangi DNR EPO, kurio aukšto lygio ekspresija ieškoma, neturės savo šaltinių šeimininko genome. Šio išradimo ekspresijos sistemos, be to, numato šiuos veiksmus, išplaukiančius į citoplazmatinį EPO produktų susidarymą ir glikozidintų ir neglikozidintų EPO produktų susikaupimą ląstelės šeimininko citoplazmoje arba membranose (pavyzdžiui, susikaupimą bakterinėse periplazmos erdvėse) arba kultūros terpės viršnuosėdų esančiuose skysčiuose, kaip anksčiau buvo paaiškinta, arba gana retose sistemose, kaip pavyzdžiui, Pige reginosa ekspresijos sistemose (aprašytose darbe Gray et al., Biotechnology, 2, 161-165(1984)).

Patobulintos šiame išradime hibridizacijos metodologijos, nors ir buvo aukščiau iliustracijai panaudotos skryningui. DNR/DNR-hibridizacijos, taip pat tinka RNR/RNR ir RNR/DNR skryningui. Mišrių zondų metodikos, kaip čia paaiškinta,

pirmiausia, sudaro eilę patobulinimų hibridizacijos procesuose, įgalindamos greičiau ir patikimiau atlikti polinukleotidų izoliaciją. Šie daugelis atskirų apdorojimo patobulinimų apima: pagerintą kolonijų pernešimą ir išlaikymo metodikas; filtrų nailono pagrindu tokių kaip Gene Screen ir Gene Screen Plus, panaudojimą, įgalinantį pakartotiną zondavimą šiais filtrais ir pakartotiną filtro panaudojimą, panaudojimą naujų gydymo proteaze metodikų (palyginkite, pvz., su Taub et al., Anal Biochem., 126, 222-230(1982); labai žemų atskirų koncentracijų panaudojimą (0,025 pikomolio eilės) didelio kiekio mišrių zondų (pavyzdžiui daugiau negu 32); ir atlikimas hibridizacijos ir post-hibridizacijos ciklų griežtuose temperatūros intervaluose arti priartėjančiuose (t.y. 4^o C ribose ir, geriau 2^o C ribose) prie mažiausios išskaičiuotos bet kurio iš naudojamų mišrių zondų disociacijos temperatūros. Šie patobulinimai siejasi su gavimu rezultatų, kurių nebuvo galima laukti. Tai pilnai paaiškinama tuo, kad mišrių zondų metodikos, turinčios 4-gubą zondų kiekį, kurie, kaip buvo nurodyta, anksčiau visada sėkmingai buvo naudojami net DNR sietuose, palyginti mažo skaitlingumo informacinės DNR rūšims, buvo sėkmingai panaudoti unikalios sekos geno izoliacijai, persijojant genominę biblioteką iš 1500000 sterilių dėmių. Šis žygdarbis buvo atliktas, iš esmės, sutapo su nuomonės publikacija Anderson et al., Supra, kad skryningo būdai, naudojant mišrius zondus buvo "... nepraktiški žinduolių genų atskyrimui, kai atitinkamos DNR neprieinamos".

Skiriamieji išradimo bruožai, atskleisti aprašyme, sekančioje išradimo apibrėžtyje ir/arba pridedamuose brėžiniuose, gali atskirai ir bet kokioj jų kombinacijoje tapti medžiaga išradimo įgyvendinimui įvairiose jo formose.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išgrynintas ir išskirtas polipeptidas, turintis dalinę arba pilną pirminę struktūrą bei vieną arba daugiau gamtinio eritropoetino biologinių savybių, besiskiriantis tuo, kad jis yra prokariotinės arba eukariotinės egzogeninės DNR sekos ekspresijos produktas.

2. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra neužterštas jokiais žinduolių baltymais.

3. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seka yra kDNR seka.

4. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seka yra sukonstruotos DNR seka.

5. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seka yra genominės DNR seka.

6. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad egzogeninės DNR seką perneša ant žiedinės DNR arba virusinio vektoriaus savireplikuojančios plazmidės.

7. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis turi dalinę arba pilną žmogaus eritropoetino arba bet kurio jo gamtinio alelinio varianto pirminę struktūrą, parodytą 6 lentelėje, o 6 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

8. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis turi dalinę arba pilną beždžionės eritropoetino arba bet kurio jo gamtinio alelinio varianto pirminę struktūrą, parodytą 5 lentelėje, o 5 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

9. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi gamtinio eritropoetino imunologinėmis savybėmis.

10. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi gamtinio eritropoetino biologiniu aktyvumu *in vivo*.

11. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi gamtinio eritropoetino biologiniu aktyvumu *in vitro*.

12. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra kovalentiškai sujungtas su nustatoma žymėta medžiaga.

13. Polipeptidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėta nustatoma žymė yra radiožymė.

14. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji užtikrina prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelėje ekspresiją tokio polipeptidinio produkto, kuris turi bent dalinę gamtinio eritropoetino pirminę struktūrą ir vieną arba daugiau jo biologinių savybių, pasirenkama iš:

a) DNR sekų, pateiktų 5 ir 6 lentelėse, o 5 ir 6 lentelės yra šios apibrėžties dalis, arba jų komplementarių grandžių;

b) DNR sekų, kurias hibridizuoja į DNR sekas, apibrėžtas (a), arba jų fragmentus; ir

c) DNR sekų, kurios dėl genetinio kodo degeneracijos turi būti hibridizuojamos į DNR sekas, apibrėžtas (a) ir (b).

15. Prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelė, besiskirianti tuo, kad ji yra transformuota arba transfektuota DNR seka pagal 14 punktą, suteikiančia galimybę šeimininko ląstelei ekspresuoti minėtą polipeptidinį produktą.

16. Polipeptidinis DNR sekos pagal 14 punktą ekspresijos produktas prokariotiniame arba eukariotiniame šeimininke.

17. Išgryninta ir išskirta DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelėse ekspresiją tokio polipeptido, kuris turi dalinę arba pilną eritropoetino pirminę struktūrą bei vieną arba daugiau jo biologinių savybių.

18. DNR seka pagal 17 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra kDNR seka.

19. Beždžionės eritropoetinas, besiskiriantis tuo, kad jis koduoja DNR seką pagal 18 punktą.

20. DNR seka pagal 19 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi baltymą, koduojanti 5 lentelėje pateiktą sritį, o 5 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

21. DNR seka pagal 17 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra genomine DNR seka.

22. Žmogaus eritropoetinas, besiskiriantis tuo, kad jis koduoja DNR seką pagal 21 punktą.

23. DNR seka pagal 22 punktą, besiskirianti tuo, kad ji turi baltymą, koduojanti 6 lentelėje pateiktą sritį, o 6 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

24. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 14 punktą.

25. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 24 punktą ir turi vieną arba daugiau kodonų, reikalingų ekspresijai *E.Coli* ląstelėse.

26. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 25 punktą ir koduoja žmogaus eritropoetino ekspresiją.

27. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 26 punktą ir turi baltymą, koduojantį 14 lentelėje pateiktą sritį, o 14 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

28. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 24 punktą ir turi vieną arba daugiau kodonų, reikalingų ekspresijai mielių ląstelėse.

29. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 28 punktą ir koduoja žmogaus eritropoetino ekspresiją.

30. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 29 punktą ir turi baltymą, koduojantį 21 lentelėje pateiktą sritį, o 21 lentelė yra šios apibrėžties dalis.

31. DNR seka pagal 17 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra kovalentiškai sujungta su nustatoma žymėta medžiaga.

32. DNR seka pagal 31 punktą, besiskirianti tuo, kad nustatoma žymė yra radiožymė.

33. DNR seka pagal 31 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra viengrandės DNR seka.

34. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja gamtinio eritropoetino polipeptidinį fragmentą arba polipeptidinį analogą.

35. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja [Phe¹⁵]hEPO, [Phe⁴⁹]hEPO, [Phe¹⁴⁵]hEPO, [His⁷]hEPO, [Asn²des-Pro²]hEPO, [des-Ihr¹⁶³]hEPO arba [27-55]hEPO.

36. DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji yra sukonstruota pagal 34 punktą.

37. Biologiškai funkcionali žiedinė plazmidė arba virusinis DNR vektorius, besiskiriantys tuo, kad juose yra DNR seka pagal bet kurią iš 14, 17, 34 arba 35 punktų.

38. Prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelė, besiskirianti tuo, kad ji yra stabiliai transformuota arba transfektuota DNR vektoriais pagal 37 punktą.

39. Polipeptidinis DNR sekos pagal 17 arba 34 punktą ekspresijos prokariotinio arba eukariotinio šeimininko ląstelėje produktas.

40. Glikoproteininis produktas, besiskiriantis tuo, kad jis turi pirminę struktūrą, kuri pakankamai dubliuoja gamtinio eritropoetino struktūrą, kad įgytų vieną arba daugiau jo biologinių savybių, bei turi vidurinę angliavandenių kompoziciją, besiskiriančią nuo gamtinio eritropoetino kompozicijos.

41. Glikoproteininis produktas, besiskiriantis tuo, kad jis turi pirminę struktūrą, kuri pakankamai dubliuoja žmogaus gamtinio eritropoetino struktūrą, kad įgytų vieną arba daugiau jo biologinių savybių, bei turi vidurinę angliavandenių kompoziciją, besiskiriančią nuo žmogaus gamtinio eritropoetino kompozicijos.

42. Stuburinių ląstelės, besiskiriančios tuo, kad jos gali be perstojo daugintis *in vitro* ir augimo kultūroje metu sugeba gaminti daugiau nei 100 vienetų (10^6 ląstelių) eritropoetino per 48 valandas (pagal radioimuninių tyrimų duomenis).

43. Stuburinių ląstelės pagal 42 punktą, besiskiriančios tuo, kad jos sugeba pagaminti daugiau nei 500 vienetų (10^6 ląstelių) eritropoetino per 48 valandas.

44. Stuburinių ląstelės pagal 42 punktą, besiskiriančios tuo, kad jos sugeba pagaminti daugiau nei 1000 vienetų (10^6 ląstelių) eritropoetino per 48 valandas.

45. Stuburinių ląstelės pagal 42 punktą, besiskiriančios tuo, kad jos yra žinduolių arba paukščių ląstelės.

46. Stuburinių ląstelės pagal 45 punktą, besiskiriančios tuo, kad jos yra COS-I arba CHO ląstelės.

47. Sintetinis polipeptidas, besiskiriantis tuo, kad jis turi dalinę arba pilną aminorūgščių seką, parodytą 5 lentelėje, o 5 lentelė yra šios apibrėžties dalis, ir turi vieną arba daugiau gamtinio bezdžionės eritropoetino biologinių aktyvumų *in vivo* ir *in vitro*.

48. Sintetinis polipeptidas, besiskiriantis tuo, kad jis turi dalinę arba pilną aminorūgščių seką, parodytą 6 lentelėje, o 6 lentelė yra šios apibrėžties dalis, bet kitokią nei seka bendroje sekoje pažymėta 1-20, ir pasižymi žmogaus gamtinio eritropoetino biologinėmis savybėmis.

49. Sintetinis polipeptidas, besiskiriantis tuo, kad jis dalinai arba pilnai pasižymi dalies arba visos aminorūgščių sekos, parodytos 6 lentelėje, o 6 lentelė yra šios apibrėžties

dalį, antrinę konformaciją, bet kitokia nei seka bendroje sekoje pažymėta 1-20, ir pasižymi žmogaus gamtinio eritropoetino biologinėmis savybėmis.

50. Polipeptidų, turinčių dalinę arba pilną pirminę struktūrą ir vieną ar daugiau gamtinio eritropoetino biologinių savybių, gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad

prokariotines arba eukariotines šeimininko ląsteles, transformuotas arba transfektuotas DNR vektoriumi pagal 37 punktą, auginama tinkamo maitinimo sąlygose ir

išskiria pageidaujamus DNR sekos šiame vektoriuje ekspresijos produktus.

51. Medžiaga-antikūnas, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi imunoreaktyvumu eritropoetino ir sintetinio polipeptido atžvilgiu ir turi pirminę struktūrą, pakankamai dubliuojančią nenutrūkstančią aminorūgščių seką, išskyrus bet kuri polipeptidą, turintį aminorūgščių seką, pilnai apimtą sekos

A-P-P-P-L-I-C-D-S-R-V-L-E-R-Y-L-L-E-A-K

ribose.

52. Antikūnas pagal 51 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra monokloninis antikūnas.

53. Antikūnas pagal 51 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra polikloninis antikūnas.

54. Antikūnas pagal 51 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis pasižymi imunoreaktyvumu eritropoetino ir sintetinio polipeptido atžvilgiu ir turi seką, pasirinktą iš šių sekų:

V-P-D-T-K-N-F-Y-A-W-K-P-M-E-V-G,

K-E-A-I-S-P-P-D-A-A-S-A-A,

V-Y-S-N-F-L-R-G-K-L-K-L-Y-T-G-E-A-C-R-T-G-D-R.

55. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad joje yra efektyvus polipeptido pagal bet kuri iš 1, 16, 39, 40 arba 41 punktų kiekis bei farmaciškai tinkamas tirpiklis, stimulatorius ir/arba nešiklis.

56. Išgryninta ir išskirta DNR seka, pateikta 5 arba 6 lentelėse, o 5 ir 6 lentelės yra šios apibrėžties dalis, ar jos fragmentas, arba tokios sekos ar fragmento komplementari grandinė.

57. DNR sekos pagal 56 punktą ekspresijos prokariotinėje arba eukariotinėje šeimininko ląstelėje polipeptidinis produktas.

58. Nežinomos sekos specifinio viengrandžio polinukleotido heterogeniniame ląsteliniame pavyzdyje, apimančiame kartotinius viengrandžius polinukleotidus, nustatymo būdas, besiskiriantis tuo, kad

a) gauna žymėtų viengrandžių polinukleotidų su tolygiai besikeičiančiomis bazių sekomis zondų mišinį, kuriame kiekvienas iš minėtų zondų yra potencialiai specifiškai komplementarus bazių sekai, kuri, kaip galima laukti, yra unikali nustatomam polinukleotidui,

b) suriša pavyzdį su kietu substratu,

c) apdoroja substratą, turintį surištą su juo pavyzdį, susilpnindami tolimesnį polinukleotidų susirišimą su juo, išskyrus hibridizacijos tikslu surištus minėto pavyzdžio polinukleotidus,

d) apdorotą substratą (turintį surištą su juo pavyzdį) tam tikrą laiką suliečia su minėtu žymėtų zondų mišiniu tokiomis sąlygomis, kurios skatina hibridizaciją tik tarp pilnai komplementarių polinukleotidų,

e) specifinį polinukleotidą nustato pagal tai, ar yra hibridizacijos reakcija tarp šio nukleotido ir pilnai komplementaraus zondo (esančio minėtame zondų mišinyje), kurią stebi pagal žymėtosios medžiagos kiekio padidėjimą substrate su specifiniu polinukleotidu, lyginant su žymėtosios medžiagos kiekiu be šio nukleotido;

be to, jis apima daugiau nei 32 sumaišytų zondų panaudojimą bei atlikimą vieno ar daugiau tokių veiksmų:

1) kietu substratu naudojamas popierius nailono pagrindu;

2) (c) stadijoje apdorojama proteaze;

3) naudojamos 0,025 pikomolio atskirų žymėtų zondų koncentracijos;

4) kaip viena iš hibridizacijos sąlygų (d) stadijoje naudojamos griežtos temperatūrų ribos, priartėjančios 4° prie žemiausios iš naudojamiems zondams apskaičiuotų Td reikšmių.

Fig.1

Žmogaus ir beždžionės rekombinantinio EPO radioimunologinio tyrimo palyginimas

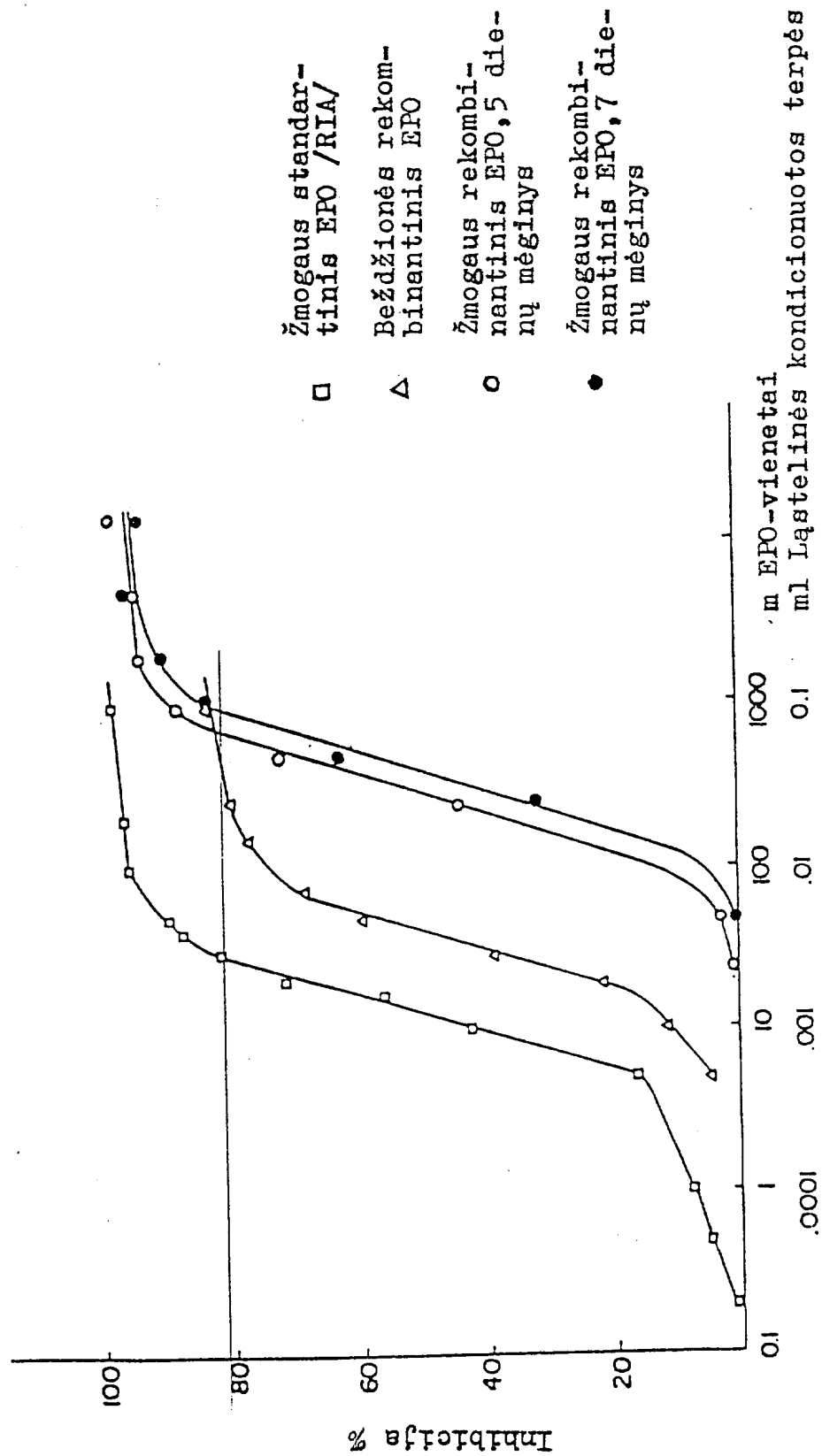


Fig.2

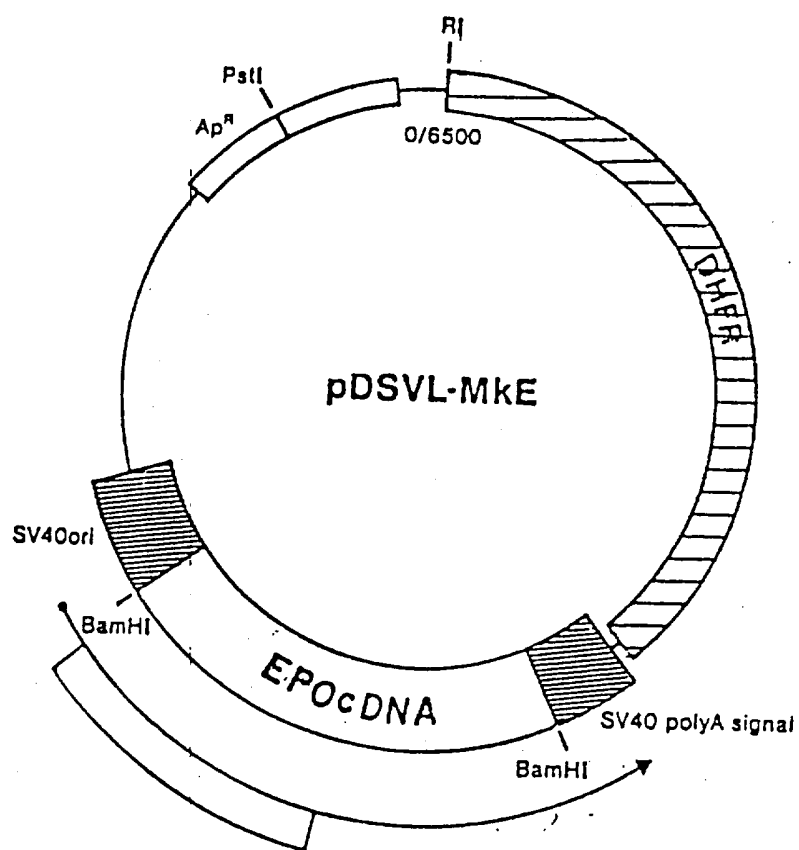


Fig.3

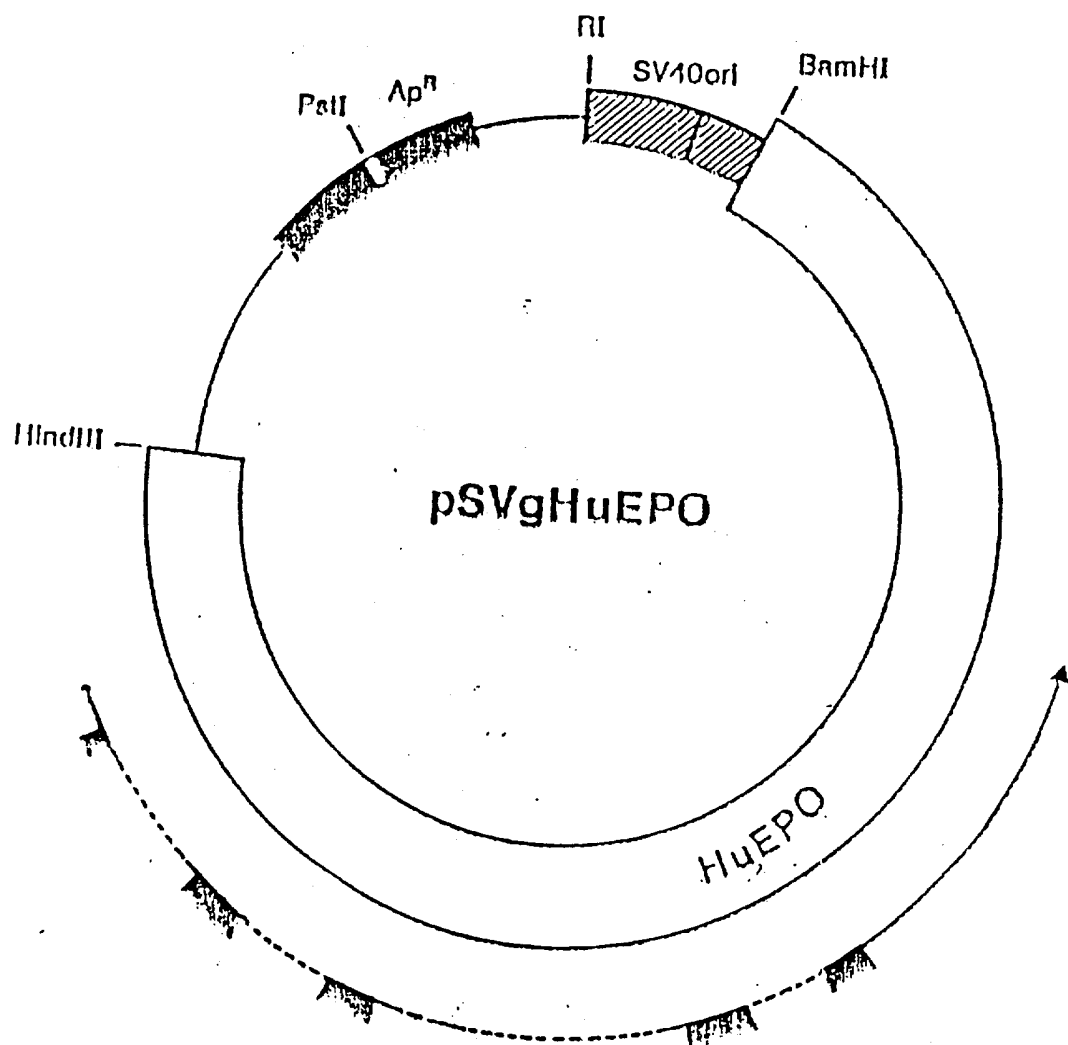


Fig.4

