

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037273

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.02

(21) Номер заявки
201491034

(22) Дата подачи заявки
2012.12.05

(51) Int. Cl. C12N 15/09 (2006.01)

(54) ЭКСПРЕССИОННАЯ КАССЕТА

(31) 61/567,675

(32) 2011.12.07

(33) US

(43) 2015.04.30

(86) PCT/IB2012/056977

(87) WO 2013/084157 2013.06.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИКНОС САЙЕНСИЗ С.А. (СН)

(72) Изобретатель:
Люшер Даниэль, Эбишер-Гуми
Кристель, Моретти Пьер, Бертшингер
Мартин (СН)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) EP-A1-1308510

GRAVEN KRISTA K. ET AL.: "Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 208-218, XP002694451, ISSN: 0006-3002, the whole document

LIMA JULIANA O. ET AL.: "The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of Theobroma cacao", GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 32, no. 2, 2009, pages 362-366, XP002694452, ISSN: 1415-4757

ERCOLANI L. ET AL.: "Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 263, no. 30, 25 October 1988 (1988-10-25), pages 15335-15341, XP000020878, ISSN: 0021-9258, the whole document

SEIDLER NORBERT W.: "Basic biology of GAPDH", ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 2013, vol. 985, 2013, pages 1-36, XP009168347, ISSN: 0065-2598, the whole document

(57) Изобретение относится к экспрессионной кассете, подходящей для экспрессии полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

B1

037273

037273

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, подходящей для экспрессии полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. Настоящее изобретение также относится к векторам и клеткам-хозяевам, которые содержат экспрессионную кассету, и применениям экспрессионной кассеты для получения полипептида из клетки-хозяина.

Уровень техники

Экспрессионные системы для получения рекомбинантных полипептидов хорошо известны в современном уровне техники и описаны, например, в Marino M.H. (1989), Biopharm, 2:18-33; Goeddel D.V. et al. (1990), Methods Enzymol 185:3-7; Wurm F. & Bernard A. (1999), Curr Opin Biotechnol. 10:156-159. Полипептиды для применения в фармацевтической области предпочтительно получают в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO (клетка яичника китайского хомяка), клетки NS0, клетки SP2/0, клетки COS (клетка африканской зеленой мартышки), клетки HEK (клетка почки эмбриона человека), клетки ВНК (клетка почки новорожденного хомяка) или т.п. Необходимые элементы экспрессионного вектора, применяемые для данной цели, обычно выбирают из единицы распространения прокариотической плазмиды, например E.coli, содержащей прокариотическую точку начала репликации и прокариотический селективный маркер, возможно эукариотического селектирующего маркера и одного или более экспрессионных кассет для экспрессии структурного(ных) гена(нов) интереса, при этом каждый содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и возможно терминатор транскрипции, включая сигнал полиаденилирования. Для временной экспрессии в клетках млекопитающих может быть включена точка начала репликации млекопитающих, такая как SV40 Ori или OriP. В качестве промотора может быть выбран конститутивный или индуцибельный промотор. Для оптимизированной транскрипции в 5' нетранслируемую область может быть включена последовательность Козака. Для процессинга мРНК (матричная РНК), в частности сплайсинга мРНК и терминции транскрипции, можно включать сигналы сплайсинга мРНК, в зависимости от организации структурного гена (экзон/интронная организация), а также сигнал полиаденилирования. Экспрессия гена осуществляется либо временно, либо с использованием стабильной клеточной линии. Уровень стабильной и высокой экспрессии полипептида в продуцирующей клеточной линии является очень важным для всего процесса продуцирования рекомбинантных полипептидов. Требование для биологических молекул, таких как белки и, в частности, антитела или фрагменты антител, значительно повысилось за последние несколько лет. Высокая стоимость и низкий выход стали лимитирующими факторами в доступности биологических молекул, и это стало большой проблемой для разработки надежных способов, которые повышают выход желательных биологических молекул в промышленном масштабе. Таким образом, все еще существует необходимость в улучшении эффективности экспрессионных векторов для получения высокого уровня экспрессии при получении рекомбинантных полипептидов.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение главным образом относится к экспрессионным системам, таким как экспрессионные кассеты и экспрессионные векторы, которые можно применять для получения повышенной экспрессии при получении рекомбинантных полипептидов. Согласно одному аспекту настоящего описания предложена экспрессионная кассета, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена экспрессионная кассета, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH, где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH, до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от 100 до около 15000 нуклеотидов, при условии, что экспрессионная кассета не содержит эукариотический промотор GAPDH или его фрагмент. Согласно другому аспекту настоящего описания предложен экспрессионный вектор, содержащий экспрессионную кассету, и клетка-хозяин, содержащая экспрессионную кассету или экспрессионный вектор, содержащий экспрессионную кассету.

Согласно еще другим аспектам настоящего описания предложен способ *in vitro* экспрессии полипептида, включающий трансфекцию клетки-хозяина экспрессионной кассетой или экспрессионным век-

тором, выделение полипептида и применение экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора для экспрессии гетерологичного полипептида из клетки-хозяина млекопитающего.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана репортерная экспрессионная конструкция (REP), состоящая из промотора цитомегаловируса мыши (mCMV), Ig-донорно-акцепторного фрагмента (IgDA), содержащего первый интрон, легкую цепь антитела IgG1 (IgG1 LC), участки внутренней посадки рибосомы, происходящие из вируса энцефаломиокардита (IRES), тяжелую цепь антитела IgG1 (IgG1 HC), зеленого флуоресцентного белка (GFP) и сигнала полиаденилирования (поли(A)) вируса SV40.

На фиг. 2 показана временная экспрессия антитела IgG1 в клетках CHO-S в сутки 5 после трансфекции (средние значения титров IgG нанесены на график для двух независимых трансфекций). Клетки трансфицировали, используя векторы GAPDH_A и GAPDH_B (GAPDH_A и GAPDH_B), такие же векторы без элементов, расположенных выше и ниже GAPDH (A и B), и вектор pGLEX41 в качестве контроля (pGLEX41). Концентрацию аккумулированного антитела IgG1 в супернатанте определяли с использованием инструмента Octet (Fortebio, Menlo, CA, США).

На фиг. 3 показана экспрессия антитела IgG1 в клетках EBNA HEK293. Клетки трансфицировали, используя векторы GAPDH_A и GAPDH_B (GAPDH_A и GAPDH_B) и вектор pGLEX41 в качестве контроля (pGLEX41). Супернатант собирали и анализировали в сутки 10 после трансфекции, используя инструмент Octet. Данные представляют N=3 независимые трансфекции в TubeSpin на вектор.

На фиг. 4 показано исследование уровня экспрессии при производстве партиями с использованием клеточных пулов. Клетки трансфицировали и создавали пулы стабильных клеток, используя векторы GAPDH_A и GAPDH_B (GAPDH_A(1), GAPDH_A(2), GAPDH_B(1) и GAPDH_B(2)), такие же векторы без элементов, расположенных выше и ниже GAPDH (A(1) и A(2)), и вектор pGLEX41 в качестве контроля (pGLEX41). После 7 дней культивирования супернатант анализировали, используя инструмент Octet на предмет аккумулированного антитела в супернатанте. Средние значения титров IgG приведены (мкг/мл) для каждого пула. Данные представляют N=2 партии на пул.

На фиг. 5 показано исследование уровня экспрессии на популяциях, полученных путем стабильной трансфекции и серийного разведения. Клетки трансфицировали, используя векторы GAPDH_A и GAPDH_B (GAPDH_A и GAPDH_B), такие же векторы без элементов, расположенных выше и ниже GAPDH (A и B), и вектор pGLEX41 в качестве контроля (pGLEX41). Среднее значение флуоресценции GFP, экспрессируемого клонами и мини-пулами из стабильных трансфекций, считывали через 14 дней после трансфекции. Клетки культивировали под давлением отбора в 96-луночных планшетах. Данные представляют N=48 клонов или мини-пулов на вектор.

На фиг. 6 показан эффект добавок к питательной среде инсулина и PMA (форбол 12-мириостат 13-ацетат, форболовый эфир) на экспрессию антитела IgG1 в супернатанте. После трансфекции вектором GAPDH_A (GAPDH_A) и вектором pGLEX41 в качестве контроля (pGLEX41) клетки либо разбавляли в среде PowerCHO2, 4 mM Gln, +/- инсулин, либо в среде PowerCHO2, 4 mM Gln, PMA +/- инсулин. Не могли наблюдать никакого различия в экспрессии для pGLEX41 (заштрихованные столбики) или GAPDH_A (незаштрихованные столбики) по сравнению со стандартной средой.

На фиг. 7 показан общий вид локуса GAPDH человека. Ген GAPDH фланкирован генами NCAPD2 и IFF01.

На фиг. 8 показано подробное описание гена GAPDH человека, элементов, расположенных выше и ниже GAPDH, и фрагментов, созданных для анализа в исследовании фрагментации последовательности выше GAPDH. Сайт рестрикции NruI вводили для облегчения этапов клонирования, и он не является частью последовательности геномной ДНК, расположенной выше 5'-GAPDH (поэтому он выделен с использованием звездочки). Размеры фрагментов являются следующими:

- фрагмент 1 (SEQ ID NO: 9): 511 п.н.,
- фрагмент 2 (SEQ ID NO: 10): 2653 п.н.,
- фрагмент 3 (SEQ ID NO: 11): 1966 п.н.,
- фрагмент 4 (SEQ ID NO: 12): 1198 п.н.,
- фрагмент 8 (SEQ ID NO: 13): 259 п.н.,
- фрагмент 9 (SEQ ID NO: 14): 1947 п.н.,
- фрагмент 11 (SEQ ID NO: 15): 1436 п.н. и
- фрагмент 17 (SEQ ID NO: 16): 1177 п.н.

На фиг. 9 показаны результаты по экспрессии фрагментации элементов, расположенных выше и ниже GAPDH. Результаты по экспрессии получали при временной трансфекции в клетках CHO в сутки 10 после трансфекции. Количественное определение проводили, используя инструмент Octet. Вектор pGLEX41 служит в качестве отрицательного контроля. pGLEX41-amp^rA также представляет собой отрицательный контроль, показывающий основной уровень экспрессии вектора без GAPDH-фланкирующих элементов. pGLEX41-up/down содержит полную длину фланкирующих (выше и в нисходящем направлении) областей и служит в качестве положительного контроля. pGLEX41-up содержит только фланкирующую область в восходящем направлении, а pGLEX41-down содержит только фланкирующую область в нисходящем направлении. Все другие конструкции содержат фрагменты, описанные на фиг. 8. Фраг-

менты 2 и 3 клонировали либо в таком же направлении, как и IgG1 LC и IgG1 HC, либо в обратном направлении относительно IgG1 LC и IgG1 HC (AS).

На фиг. 10 показана временная экспрессия антитела IgG1 в клетках CHO-S в сутки 8 после трансфекции (средние значения титров IgG нанесены на график для трех независимых трансфекций; планки погрешности: SD +/-). Клетки трансфицировали, используя векторы с элементом, расположенным выше GAPDH китайского хомяка, в комбинации с CMV мыши (A_GAPDH_UP) или промотором GAPDH китайского хомяка (A_GAPDH_UP_PR). Плазмидами, имеющими только CMV мыши (A) или промотор GAPDH китайского хомяка (APR), трансфицировали в качестве контроля. Концентрацию аккумулярованного антитела IgG1 в супернатанте определяли, используя инструмент Octet QK (Fortebio, Menlo, CA, США).

Подробное описание изобретения

Настоящее описание относится к экспрессионным кассетам и экспрессионным векторам, которые содержат промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов.

Настоящее описание дополнительно относится к экспрессионной кассете, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH, где полинуклеотид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, охватывающей район от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от 100 до около 15000 нуклеотидов, при условии, что экспрессионная кассета не содержит эукариотического промотора GAPDH или его фрагментов.

Термин "экспрессионная кассета", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, подлежащую экспрессии, и последовательности, регулирующие ее экспрессию, такие как промотор и возможно последовательность энхансера, включая любую комбинацию цис-действующих транскрипционных регуляторных элементов. Последовательности, регулирующие экспрессию гена, т.е. его транскрипцию и трансляцию продукта транскрипции, обычно называются регуляторной единицей. Большинство частей регуляторной единицы локализованы выше кодирующей последовательности гена и функционально с ней связаны. Экспрессионная кассета может также содержать расположенную в нисходящем направлении 3'-нетранслируемую область, содержащую сайт полиаденилирования. Регуляторная единица согласно изобретению либо функционально связана с геном, подлежащим экспрессии, т.е. единицей транскрипции, либо отделена от него вклинивающейся ДНК, например 5'-нетранслируемой областью гетерологичного гена. Предпочтительно экспрессионная кассета фланкирована одним или большим числом подходящих сайтов рестрикции для предоставления возможности вставлять экспрессионную кассету в вектор и/или вырезать ее из вектора. Таким образом, экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению можно использовать для конструирования экспрессионного вектора, в частности экспрессионного вектора млекопитающего. Экспрессионная кассета согласно настоящему изобретению может содержать одну или более, например две, три или даже более, нетранслируемых последовательностей геномной ДНК, расположенных ниже эукариотического промотора GAPDH, или их фрагменты и/или одну или более, например две, три или даже более, нетранслируемых последовательностей геномной ДНК, расположенных выше эукариотического промотора GAPDH, или их фрагменты. В том случае, когда данная экспрессионная кассета согласно настоящему изобретению содержит более чем одну последовательность ДНК, расположенную ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, или их фрагменты, данные последовательности ДНК могут быть непосредственно связаны, т.е. могут содержать линкерные последовательности, например линкерные последовательности, содержащие рестрикционные сайты, которые присоединены к 5'- и 3'-концам и которые делают возможным удобное последовательное клонирование последовательностей или их фрагментов. В качестве альтернативы последовательности ДНК ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH или их фрагменты могут не быть непосредственно связаны, т.е. могут быть клонированы с лежащими между ними последовательностями ДНК.

Термин "полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает ДНК, кодирующую ген, предпочтительно гетерологичный

ген, экспрессирующий полипептид.

Термины "гетерологичная кодирующая последовательность", "гетерологичная последовательность гена", "гетерологичный ген", "рекомбинантный ген" или "ген" используются взаимозаменяемо. Данные термины относятся к последовательности ДНК, которая кодирует рекомбинант, в частности рекомбинантный гетерологичный белковый продукт, экспрессию которого пытаются обнаружить в клетке-хозяине, предпочтительно в клетке млекопитающего, и которого собирают. Продукт гена может представлять собой полипептид. Гетерологичная последовательность гена в природе не присутствует в клетке-хозяине и происходит из организма того же или другого вида, и может быть генетически модифицирована.

Термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо с включением серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбоксильными группами смежных остатков.

Термин "нетранслируемая последовательность геномной ДНК", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает ДНК, которая составляет генетическую информацию организма. Геном почти всех организмов представляет собой ДНК, при этом единственным исключением являются некоторые вирусы, которые имеют геном на основе РНК. Молекулы геномной ДНК в большинстве организмов организованы в комплексы ДНК-белок, называемые хромосомами. Размер, число хромосом и природа геномной ДНК варьируют среди разных организмов. Вирусные геномы на основе ДНК могут быть одно- или двухцепочечными, линейными или кольцевыми. Все другие организмы имеют геномы на основе двухцепочечной ДНК. Бактерии имеют одну кольцевую хромосому. У эукариот большая часть геномной ДНК локализована в ядре (ядерная ДНК) в виде большого количества линейных хромосом разного размера. Эукариотические клетки дополнительно содержат геномную ДНК в митохондриях и у растений и низших эукариот - в хлоропластах. Данная ДНК обычно представляет собой кольцевую ДНК и находится в виде большого числа копий в данных органеллах. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК в обычном состоянии функционально не связана с промотором и, таким образом, не транслируется. Она может содержать ген(ы), который(ые) не транслируется(ются), таким образом, ген(ы), который(ые) кодирует(ют), например, белок, который не экспрессируется.

Термин "нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH", в том виде, как он используется в настоящем описании, соответствует нетранслируемой эукариотической геномной ДНК, расположенной в направлении 3' от эукариотического промотора GAPDH. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК ниже эукариотического промотора GAPDH обычно начинается около положения нуклеотида +1, предпочтительно в положении нуклеотида +1, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, т.е. относительно точки инициации транскрипции эукариотического гена, кодирующего GAPDH. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, обычно имеет такое же происхождение, как эукариотический промотор GAPDH, например, если промотор GAPDH человеческого происхождения, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH человека, также имеет человеческое происхождение и соответствует встречающейся в природе последовательности геномной ДНК человека, расположенной ниже промотора GAPDH человека.

Термин "нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH", в том виде, как он используется в настоящем описании, соответствует нетранслируемой эукариотической геномной ДНК, расположенной в направлении 5' от эукариотического промотора GAPDH. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК выше эукариотического промотора GAPDH обычно начинается в положении нуклеотида около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH, предпочтительно в положении нуклеотида непосредственно после 5'-конца эукариотического промотора GAPDH. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, обычно имеет такое же происхождение, как эукариотический промотор GAPDH, например, если промотор GAPDH является человеческого происхождения, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH человека, также имеет человеческое происхождение и соответствует встречающейся в природе последовательности геномной ДНК человека, расположенной выше промотора GAPDH человека.

Положения эукариотического промотора GAPDH, нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже или выше эукариотического промотора GAPDH, и других последовательностей ДНК в том виде, как они показаны в настоящем описании, определены относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, например относительно точки инициации транскрипции эукариотического GAPDH, если не указано иное.

Термин "нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, распространяется до" или "нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяется до" используется для определения протяженности длины нетранслируемой последовательности, расположенной выше и/или ниже эукариотического промотора GAPDH, от начала до определенного элемента гена, например протя-

женность до интрона. Данная протяженность включает полную длину последовательности ДНК, кодирующей элемент гена, например интрон или его часть.

Эукариотический промотор GAPDH и эукариотическую геномную ДНК, расположенную выше и/или ниже промотора GAPDH, можно найти для человека, крысы и мыши в общедоступном банке данных NCBI (вводимые данные для гена GAPDH человека, мыши, крысы и китайского хомяка представляют собой ID гена 2597 (мРНК: NM_002046.3), 14433 (мРНК: NM_008084.2), 24383 (мРНК: NM_017008.3) и 100736557 (мРНК: NM_001244854.2) соответственно; Национальный Центр Биотехнологической Информации (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), и они в качестве примера показаны на фиг. 7 и 8 для гена GAPDH человека.

Считается, что эукариотический промотор GAPDH обычно простирается от около (п.н.) -500 до около +50 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH. Промотор GAPDH человека локализован на хромосоме 12. Graven et al. (Graven et al., (1999), *Biochimica et Biophysica Acta*, 147:203-218) считают, что промотор GAPDH человека простирается от (п.н.) -488 до +20 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH на основе исследования фрагментации. Согласно общедоступному банку данных NCBI промотор GAPDH человека простирается от (п.н.) -462 до +46 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, как определено общедоступным банком данных NCBI. Если не указано иное, промотор GAPDH человека, как изложено в настоящем описании, простирается от -462 до положения +46 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, что соответствует последовательности, простирающейся от (п.н.) 4071 до 4578 SEQ ID NO: 17.

Нумерация, используемая для ДНК гена GAPDH, гена IFF01 и гена NCAPD2 человеческого, мышинного и крысиного происхождения, как изложено в настоящем описании, соответствует нумерации, используемой для данных генов в общедоступном банке данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Термин "промотор", в том виде, как он используется в настоящем описании, определяет регуляторную последовательность ДНК, обычно локализованную выше гена, которая содействует инициации транскрипции путем направления РНК-полимеразы на связывание с ДНК и инициирования синтеза РНК.

Термин "энхансер", в том виде, как он используется в настоящем описании, определяет нуклеотидную последовательность, которая влияет на усиление транскрипции генов независимо от природы гена, положения последовательности относительно гена или ориентации последовательности. Векторы согласно настоящему изобретению возможно включают энхансеры.

Термины "функционально связан" и "связан функциональным образом" используются взаимозаменяемо и относятся к функциональной связи между двумя или большим числом сегментов ДНК, в частности последовательностями гена, подлежащими экспрессии, и последовательностями, регулирующими их экспрессию. Например, последовательность промотора и/или энхансера, включая любую комбинацию цис-действующих транскрипционных регуляторных элементов, связана функциональным образом с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе. Промоторные регуляторные последовательности, которые функциональным образом связаны с транскрибируемой последовательностью гена, физически граничат с транскрибируемой последовательностью.

"Ориентация" относится к порядку нуклеотидов в данной последовательности ДНК. Например, ориентация последовательности ДНК в обратном направлении по отношению к другой последовательности ДНК представляет собой ориентацию, при которой порядок последовательности от 5' к 3' относительно другой последовательности является обратным по сравнению с опорной точкой в ДНК, из которой была получена последовательность. Такие опорные точки могут включать направление транскрипции других определенных последовательностей ДНК в источнике ДНК и/или точку начала репликации реплицируемых векторов, содержащих последовательность.

Термин "экспрессионный вектор", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает выделенную и очищенную молекулу ДНК, которая при трансфекции соответствующей клетки-хозяина обеспечивает высокоуровневую экспрессию продукта рекомбинантного гена в клетке-хозяине. Помимо последовательности ДНК, кодирующей рекомбинант или продукт гена, экспрессионный вектор содержит регуляторные последовательности ДНК, которые требуются для эффективной транскрипции ДНК-кодирующей последовательности в мРНК и для эффективной трансляции мРНК в белки в линии клеток-хозяев.

Термины "клетка-хозяин" или "линия клеток-хозяев", в том виде, как они используются в настоящем описании, включают любые клетки, в частности клетки млекопитающих, которые способны расти в культуре и экспрессируют желаемый рекомбинантный белок-продукт.

Термин "фрагмент", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает часть соответствующей нуклеотидной последовательности, например часть нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей определенный элемент гена, такой как промотор. Фрагменты нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, могут поддерживать биологическую активность и, следовательно, изменять, например повышать, уровни экспрессии кодирующих последовательностей, функционально связанных с

промотором. Фрагменты нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, могут находиться в диапазоне по меньшей мере от примерно 100 до примерно 3000 п.н., предпочтительно от примерно 200 до примерно 2800 п.н., более предпочтительно от примерно 300 до примерно 2000 п.н. нуклеотидов, в частности от примерно 500 до примерно 1500 п.н. нуклеотидов. Для клонирования фрагментов нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, в экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению, обычно к 5'- и 3'-концам фрагментов присоединяют линкерные последовательности, содержащие рестрикционные сайты, которые делают возможным удобное клонирование.

Термин "идентичность нуклеотидной последовательности" или "идентичная нуклеотидная последовательность", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает процентное содержание нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны нуклеотидной последовательности, например, нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, в случае необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Таким образом, идентичность последовательностей можно определять стандартными способами, которые обычно используют для сравнения сходства в положении нуклеотидов двух нуклеотидных последовательностей. Обычно идентичность нуклеотидной последовательности-кандидата с нетранслируемой последовательностью геномной ДНК, расположенной ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, в частности 96%, более конкретно 97%, даже более конкретно 98%, наиболее конкретно 99%, включая, например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100%.

Термин "сайт CpG", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает области ДНК, в которых цитозинный нуклеотид встречается рядом с гуаниновым нуклеотидом в линейной последовательности оснований вдоль ее длины. "CpG" представляет собой условное обозначение для "-С-фосфат-G-", т.е. цитозина и гуанина, разделенных только одним фосфатом; фосфат связывает вместе любые два нуклеотида в ДНК. Обозначение "CpG" используют для того, чтобы отличать данную линейную последовательность от спаривания оснований цитозана и гуанина CG.

Термин "частота использования альтернативного кодона", в том виде, как он используется в настоящем описании, включает частоту использования альтернативных кодонов, кодирующих такую же аминокислоту, для избежания мотива последовательности CpG. Данный термин включает использование предпочтительно кодонов, не имеющих внутреннего сайта CpG (например, GCG, кодирующий аланин и содержащий сайт CpG, можно было бы заменять или GCT, GCC, или GCA), а также недопущение соединения двух кодонов, которое приводит к новому сайту CpG.

Термин "около", в том виде, как он используется в настоящем описании в отношении длины последовательности ДНК и в отношении положения нуклеотида, который определяют относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, например, относительно точки инициации транскрипции эукариотического GAPDH, включает значения с отклонениями, составляющими максимум $\pm 50\%$, обычно максимум $\pm 10\%$ установленных значений, например, "около 300 нуклеотидов" включает значения от 2700 до 3300 нуклеотидов, предпочтительно от 2900 до 3100 нуклеотидов, более предпочтительно от 2995 до 3005 нуклеотидов, "около 100 нуклеотидов" включает значения от 50 до 150 нуклеотидов, предпочтительно от 90 до 110 нуклеотидов, более предпочтительно от 95 до 105 нуклеотидов, "около 15000 нуклеотидов" включает значения от 13500 до 16500 нуклеотидов, предпочтительно от 14500 до 15500 нуклеотидов, более предпочтительно от 14990 до 15010 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от 14995 до 15005 нуклеотидов, "около 200 нуклеотидов" включает значения от 150 до 250 нуклеотидов, предпочтительно от 190 до 210 нуклеотидов, более предпочтительно от 195 до 205 нуклеотидов, "около 8000 нуклеотидов" включает значения от 7200 до 8800, предпочтительно 7500 до 8500 нуклеотидов, более предпочтительно от 7990 до 8010 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от 7995 до 8005 нуклеотидов, "около 500 нуклеотидов" включает значения 450 до 550 нуклеотидов, предпочтительно от 475 до 525, более предпочтительно от 490 до 510, наиболее предпочтительно от 495 до 505 нуклеотидов, "около 5000 нуклеотидов" включает значения от 4500 до 5500 нуклеотидов, предпочтительно от 4750 до 5250, более предпочтительно от 4990 до 5010, наиболее предпочтительно от 4995 до 5005 нуклеотидов, "около 1000 нуклеотидов" включает значения от 900 до 1100 нуклеотидов, предпочтительно от 950 до 1050, более предпочтительно от 990 до 1010, наиболее предпочтительно от 995 до 1005 нуклеотидов, "около 4500 нуклеотидов" включает значения от 4050 до 4950 нуклеотидов, предпочтительно от 4250 до 4750, более предпочтительно от 4490 до 4510, наиболее предпочтительно от 4495 до 4505 нуклеотидов, "около 1500 нуклеотидов" включает значения от 1350 до 1650 нуклеотидов, предпочтительно от 1450 до 1550, более предпочтительно от 1490 до 1510, наиболее предпочтительно от 1495 до 1505 нуклеотидов, "около 4000 нуклеотидов" включает значения от 3600 до 4400 нуклеотидов, предпочтительно от 3800 до 4200, более предпочтительно от 3990 до 4010, более предпочтительно от 3995 до 4005 нуклеотидов, "около 2000

нуклеотидов" включает значения от 1800 до 2200 нуклеотидов, предпочтительно от 1900 до 2100, более предпочтительно от 1990 до 2010, наиболее предпочтительно от 1995 до 2005 нуклеотидов, "около 3500 нуклеотидов" включает значения от 3150 до 3850 нуклеотидов, предпочтительно от 3300 до 3700, более предпочтительно от 3490 до 3510, наиболее предпочтительно от 3495 до 3505 нуклеотидов, "около 2700 нуклеотидов" включает значения от 2430 до 2970 нуклеотидов, предпочтительно от 2600 до 2800, более предпочтительно от 2690 до 2710, наиболее предпочтительно от 2695 до 2705 нуклеотидов, "около 3300 нуклеотидов" включает значения от 2970 до 3630 нуклеотидов, предпочтительно от 3100 до 3500, более предпочтительно от 3290 до 3310, наиболее предпочтительно от 3295 до 3305 нуклеотидов, "около 3200 нуклеотидов" включает значения от 2880 до 3520 нуклеотидов, предпочтительно от 3000 до 3400, более предпочтительно от 3190 до 3210, наиболее предпочтительно от 3195 до 3205 нуклеотидов, около +7000 или около положения +7000 включает положения от +6300 до +7700, предпочтительно положения от +6700 до +7300, более предпочтительно положения от +6990 до +7010, наиболее предпочтительно положения от +6995 до +7005, около +1 или около положения +1 включает положения от -10 до +10, предпочтительно положения от -5 до +5, более предпочтительно положения от -1 до +2, около -3500 или около положения -3500 включает положения от -3150 до -3850, предпочтительно положения от -3300 до -3700, более предпочтительно положения от -3490 до -5010, наиболее предпочтительно положения от -3495 до -3505.

Термин "около", в том виде, как он используется в настоящем описании в отношении нумерации, используемой для ДНК гена GAPDH, гена IFF01 и гена NCAPD2 человеческого, мышинного и крысиного происхождения, как изложено в настоящем описании, или в том виде, как он используется в настоящем описании в отношении положения в последовательности SEQ ID номер, включает значения с отклонениями, составляющими максимум ± 500 п.н., предпочтительно ± 100 п.н., более предпочтительно ± 10 п.н., наиболее предпочтительно ± 5 п.н.

Согласно одному варианту реализации настоящего описания предложена экспрессионная кассета, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH, где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида относят к точке начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и доходит при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 или до его части. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и доходит при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01.

Ген IFF01 человека локализован в ДНК человека около (п.н.) 6665249-6648694 хромосомы 12 (NCBI ID гена: 25900). Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у человека, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 6650677 хромосомы 12, кодирующей ген IFF01 у человека (положение +7021). Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 у человека, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 6657230 хромосомы 12, кодирующей ген IFF01 у человека (положение +13574). Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у человека и до предпоследнего интрона гена IFF01 у человека соответственно включены в SEQ ID NO: 17, которая демонстрирует (п.н.) 6657230-6639125 хромосомы 12 (NCBI ID гена: 25900). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона, простирается до около (п.н.) 11553 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 17, и нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона, простирается до около (п.н.) 18106 нуклеотидной последовательности, как показано SEQ ID NO: 17.

Мышиный ген IFF01 (NCBI ID гена: 320678) локализован в ДНК мыши около (п.н.) 12095259-125111800 хромосомы 6. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у мыши, простирается при своей мак-

симальной длине до около (п.н.) 125109211 хромосомы 6, кодирующей ген IFF01 у мыши (положение +6391). Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 у мыши, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 125103521 хромосомы 6, кодирующей ген IFF01 у мыши (положение +12081). Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона и до предпоследнего интрона гена IFF01 у мыши соответственно, включены в SEQ ID NO: 18, которая демонстрирует (п.н.) 125103521-125119832 хромосомы 6 (NCBI ID гена: 320678). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона гена IFF01 у мыши, простирается до около (п.н.) 10622 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 18, и нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона гена IFF01 у мыши, простирается до около (п.н.) 16312 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 18.

Крысиний ген IFF01 (NCBI ID гена: 362437) локализован в ДНК крысы около (п.н.) 161264966-161282150 хромосомы 4. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у крысы, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 161280937 хромосомы 4, кодирующей ген IFF01 у крысы (положение +5154). Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 у крысы, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 161279451 хромосомы 4, кодирующей ген IFF01 у крысы (положение +6640).

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона и предпоследнего интрона гена IFF01 у крысы соответственно, включены в SEQ ID NO: 19, которая демонстрирует (п.н.) 161279451-161290508 хромосомы 4 (NCBI ID гена: 362437). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона гена IFF01, простирается до около (п.н.) 9572 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 19, и нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона гена IFF01, простирается до около (п.н.) 11058 п.н. нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 19.

Ген IFF01 китайского хомяка (NCBI ID гена: 100753382) локализован в ДНК китайского хомяка около (п.н.) 3577293-3593683. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до последнего интрона гена IFF01 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 3579014, кодируя ген IFF01 у китайского хомяка (положение +6883). Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 3585061, кодируя ген IFF01 у китайского хомяка (положение +12930). Хромосомная локализация еще не аннотирована в банке данных NCBI, и текущая информация о последовательностях содержит много неизвестных оснований. В связи с этим, точная аннотация границ может меняться с доступностью более точной информации о последовательности.

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона и до предпоследнего интрона гена IFF01 у китайского хомяка соответственно, включены в SEQ ID NO: 29, которая демонстрирует (п.н.) 3567932-3585061. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона гена IFF01, простирается до около (п.н.) 11083 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 29, и нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона гена IFF01, простирается до около (п.н.) 17130 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 29.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в сайте полиаденилирования эукариотического GAPDH, например, начинается в районе первого нуклеотида, кодирующего сайт полиаденилирования эукариотического GAPDH. В предпочтительном варианте нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается ниже сайта полиаденилирования эукариотического GAPDH, например, начинается непосредственно после последне-

го нуклеотида, кодирующего сайт полиаденилирования эукариотического GAPDH. Даже в более предпочтительном варианте нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается ниже сайта полиаденилирования эукариотического GAPDH, и длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и простирается при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01.

Согласно одному варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +3881 до положения нуклеотида около +5000, предпочтительно в пределах области, охватывающей район от положения нуклеотида около +3931 до положения нуклеотида около +5000, более предпочтительно в пределах области, охватывающей район от положения нуклеотида около +4070 до положения нуклеотида около +5000, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, которая начинается, например, ниже сайта полиаденилирования эукариотического GAPDH, используемого в настоящем изобретении, обычно начинается в положении нуклеотида около положения +3931, предпочтительно в положении нуклеотида около +4070, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH.

У человека нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже сайта полиаденилирования GAPDH человека, начинается около положения нуклеотида +3931 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, которая соответствует (п.н.) 8463, как показано в SEQ ID NO: 17). В предпочтительном варианте, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже сайта полиаденилирования GAPDH, является человеческого происхождения, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже сайта полиаденилирования GAPDH, начинается около +3931 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, которая соответствует (п.н.) 8463, как показано в SEQ ID NO: 17), и ее длина составляет около 3357 п.н., что соответствует последовательности от около (п.н.) 8463 до около 11819, как показано в SEQ ID NO: 17, более предпочтительно она начинается около +4070 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, которая соответствует (п.н.) 8602, как показано в SEQ ID NO: 17), и ее длина составляет около 3218 п.н., что соответствует последовательности от около (п.н.) 8602 до около 11819, как показано в SEQ ID NO: 17.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов, содержит пять или меньше, в предпочтительном варианте четыре или меньше, более предпочтительно три или меньше, наиболее предпочтительно два или меньше, в частности одну модификацию нуклеиновой кислоты, где модификация(ии) нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет(ют) собой замену в нуклеиновой кислоте.

Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, предпочтительно составляет от около 200 до около 8000 нуклеотидов, более предпочтительно от около 500 до около 5000 нуклеотидов, даже более предпочтительно от около 1000 до около 4500 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от около 1500 до около 4000 нуклеотидов, в частности от около 2000 до около 3500 нуклеотидов, более конкретно от около 2700 до около 3300, даже более конкретно около 3200, наиболее конкретно 3218 нуклеотидов. Длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, как определено в настоящем описании, не включает каких-либо линкерных последовательностей, добавленных к нетранслируемой последовательности геномной ДНК.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, ориентирована в том же направлении, как и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, ориентирована в противоположном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH, дополнительно содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH, где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов.

Согласно другому варианту реализации экспрессионная кассета содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH, где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, охватывающей район от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов, при условии, что экспрессионная кассета не содержит эукариотический промотор GAPDH или его фрагменты.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета дополнительно содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH, где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов. Согласно данным вариантам реализации используемая нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, представляет собой такую, как, например, описано выше.

Согласно некоторым вариантам реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, предпочтительно составляет от около 200 до около 8000 нуклеотидов, более предпочтительно от около 500 до около 5000 нуклеотидов, даже более предпочтительно от около 1000 до около 4500 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от около 1500 до около 4000 нуклеотидов, в частности от около 2000 до около 3500 нуклеотидов, более конкретно от около 2700 до около 3300, даже более конкретно около 3200, наиболее конкретно 3158 нуклеотидов в длину. Длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, как определено в настоящем описании, не включает каких-либо линкерных последовательностей, добавленных к нетранслируемой последовательности геномной ДНК.

Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, по меньшей мере составляет около 100 нуклеотидов и распространяется при своей максимальной длине до старт-кодона гена NCAPD2. Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и распространяется при своей максимальной длине до третьего с конца интрона гена NCAPD2. Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и распространяется при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена NCAPD2. Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов и распространяется при своей максимальной длине до последнего интрона гена NCAPD2.

Человеческий ген NCAPD2 (NCBI ID гена: 9918) локализован в ДНК человека около (п.н.) 6603298-6641132 хромосомы 12. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена NCAPD2 у человека, простирается при своей максимальной длине до около 6640243 п.н. хромосомы 12, кодирующей ген NCAPD2 у человека (положение -3414 относительно точки начала транскрипции гена GAPDH, что соответствует (п.н.) 1119 в SEQ ID NO: 17).

Согласно другому варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена NCAPD2 у человека, простирается при своей максимальной длине до около 6639984 п.н. хромосомы 12, кодирующей ген NCAPD2 у человека (положение

-3673 относительно точки начала транскрипции гена GAPDH, что соответствует (п.н.) 860 в SEQ ID NO: 17).

Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у человека, простирается при своей максимальной длине до около 6639125 п.н. хромосомы 12, кодирующей ген NCAPD2 у человека (положение -4532 относительно точки начала транскрипции гена GAPDH, что соответствует (п.н.) 1 в SEQ ID NO: 17).

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона, предпоследнего интрона и до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у человека соответственно, включены в SEQ ID NO: 17, которая демонстрирует (п.н.) 6657230-6639125 хромосомы 12 (NCBI ID гена: 9918).

Мышиный ген NCAPD2 (ID гена: 68298) локализован в ДНК мыши около положения 125118025-125141604 хромосомы 6. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH (предположительно имеет длину 500 п.н. выше точки начала транскрипции), распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена NCAPD2 у мыши, простирается при своей максимальной длине до около (п.н.) 125118607 хромосомы 6, кодирующей ген NCAPD2 у мыши.

Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена NCAPD2 у мыши, простирается при своей максимальной длине до около 125118880 п.н. хромосомы 6, кодирующей ген NCAPD2 у мыши.

Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у мыши, простирается при своей максимальной длине до около 125119832 п.н. хромосомы 6, кодирующей ген NCAPD2 у мыши.

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона, до предпоследнего интрона и до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у мыши соответственно, включены в SEQ ID NO: 18, которая демонстрирует (п.н.) 125103521-125119832 хромосомы 6 (NCBI ID гена: 68298). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона, простирается до около (п.н.) 1226 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 18 (-3006 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH мыши). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона, простирается до около (п.н.) 953 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 18 (-3279 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH мыши). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до третьего с конца интрона, простирается до около (п.н.) 1 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 18 (-4231 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH мыши).

Крысиный ген NCAPD2 (ID гена: 362438) локализован в эукариотической ДНК около положения 161288671-161310417 хромосомы 4. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена NCAPD2 у крысы, простирается при своей максимальной длине до около 161289191 п.н. хромосомы 4, кодирующей ген NCAPD2 у крысы. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена NCAPD2 у крысы, простирается при своей максимальной длине до около 161289446 п.н. хромосомы 4, кодирующей ген NCAPD2 у крысы. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у крысы, простирается при своей максимальной длине до около 161290508 п.н. хромосомы 4, кодирующей ген NCAPD2 у крысы.

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона, до предпоследнего интрона и до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у крысы соответственно, включены в SEQ ID NO: 19, которая демонстрирует (п.н.) 161279451-161290508 хромосомы 4 (NCBI ID гена: 362438). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона, простирается до около (п.н.) 1318 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 19 (-3101 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH крысы). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона, простирается до около (п.н.) 1063 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 19 (положение

-3356 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH крысы). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до третьего с конца интрона, простирается до около (п.н.) 1 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 19 (положение -4418 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH крысы).

Ген NCAPD2 китайского хомяка (ID гена: 100753087) локализован в эукариотической ДНК около положения 3544184-3569879. Хромосомная локализация не является доступной в базе данных NCBI. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до последнего интрона гена NCAPD2 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до около 3569380 п.н. у китайского хомяка. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена NCAPD2 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до около 3569131 п.н. у китайского хомяка. Согласно одному варианту реализации длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющейся при своей максимальной длине до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у китайского хомяка, простирается при своей максимальной длине до около 3567932 п.н. у китайского хомяка.

Нетранслируемые последовательности геномной ДНК, расположенные выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющиеся при своей максимальной длине до последнего интрона, до предпоследнего интрона и до третьего с конца интрона гена NCAPD2 у китайского хомяка соответственно, включены в SEQ ID NO: 29, которая демонстрирует (п.н.) 3567932-3585061. Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до последнего интрона, простирается до около (п.н.) 1449 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 29 (-2752 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH китайского хомяка). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до предпоследнего интрона, простирается до около (п.н.) 1200 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 29 (положение -3001 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH китайского хомяка). Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, распространяющаяся до третьего с конца интрона, простирается до около (п.н.) 1 нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 29 (положение -4200 относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH китайского хомяка).

Согласно некоторым вариантам реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается обычно в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около -500 до положения нуклеотида около -3500, предпочтительно в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около -576 до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH.

Согласно некоторым вариантам реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается обычно в положении нуклеотида около положения -500, предпочтительно в положении нуклеотида около -576, где положение нуклеотида определяют относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH.

У человека нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH человека, начинается около положения нуклеотида -463 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, что соответствует (п.н.) 4533, как показано в SEQ ID NO: 17). В предпочтительном варианте, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH, является человеческого происхождения, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH, начинается около -500 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, которая соответствует (п.н.) 4533, как показано в SEQ ID NO: 17). В более предпочтительном варианте, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH, является человеческого происхождения, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH, начинается около -576 (относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, что соответствует (п.н.) 4533, как показано в SEQ ID NO: 17), и ее длина составляет около 3158 п.н., что соответствует последовательности от около (п.н.) 800 до около 3957, как показано в SEQ ID NO: 17.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов, предпочтительно нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16 или их фрагментов, или нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 и 16 или их

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов, в предпочтительном варианте нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16 или их фрагментов, или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 и 16 или их фрагментов. Более предпочтительной является нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80% идентичная нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 12, 15 и 16 или их фрагментов, более предпочтительно нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80% идентичная нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 12, 15 и 16 или их фрагментов, где нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 10 и/или 16, ориентированы в обратном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, и нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 12 и/или 15, ориентированы в том же направлении, как и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид. В равной степени более предпочтительной является нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80% идентичная нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 28 и 16 или их фрагментов, более предпочтительной является нуклеотидная последовательность, по меньшей мере на 80% идентичная нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 28 и 16 или их фрагментов, где нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 23 и/или 16, ориентированы в обратном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, и нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 25 и/или 28, ориентированы в том же направлении, как и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 14, 20, 22, 24, и 27 или их фрагментов, содержит пять или меньше, предпочтительно четыре или меньше, более предпочтительно три или меньше, наиболее предпочтительно две или меньше, в частности одну, модификации нуклеиновой кислоты, где модификация(ции) нуклеиновой кислоты в предпочтительном варианте представляет(ют) собой замену в нуклеи-

новой кислоте.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 11, 14 или их фрагментов, содержит одну замену в нуклеиновой кислоте в положении 16 относительно начала нуклеиновой последовательности SEQ ID NO: 7, 9, 11, 14. В предпочтительном варианте G в положении 16 относительно начала нуклеотидной последовательности заменяют T.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24 и 27 или их фрагментов, содержит одну замену в нуклеиновой кислоте в положении 13 относительно начала нуклеиновой последовательности SEQ ID NO: 20, 22, 24 и 27. В предпочтительном варианте G в положении 13 относительно начала нуклеотидной последовательности заменяют T.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, ориентирована в том же направлении, как полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид.

Согласно другому варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, ориентирована в обратном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

Согласно предпочтительному варианту реализации экспрессионная кассета содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора, как описано выше. В предпочтительном варианте происхождение нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, и нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, является одинаковым, т.е. из одного и того же вида. В более предпочтительном варианте происхождение нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, и клетки-хозяина является одинаковым, т.е. из одного и того же вида, например, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, и клетка-хозяин происходят из одного и того же млекопитающего, например, из человека.

Согласно некоторым вариантам реализации, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК из одного вида, промотор экспрессионной кассеты не является промотором GAPDH из того же вида.

Согласно некоторым вариантам реализации, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH человеческого происхождения, промотор экспрессионной кассеты не является промотором GAPDH человека.

Согласно некоторым вариантам реализации промотор экспрессионной кассеты не является промотором GAPDH. Согласно одному варианту реализации, если экспрессионная кассета содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), где полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH, где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, простирающейся от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH, до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определяют относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов, промотор экспрессионной кассеты может представлять собой эукариотический промотор GAPDH, предпочтительно промотор GAPDH млекопитающего, более предпочтительно промотор GAPDH грызуна или человека. Согласно данному варианту реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинающаяся в пределах области, простирающейся от около 5'-конца эукариотического про-

мотора GAPDH до положения нуклеотида около -3500, предпочтительно локализована непосредственно выше эукариотического промотора GAPDH, более предпочтительно согласно данному варианту реализации экспрессионная кассета содержит встречающуюся в природе последовательность геномной ДНК, содержащую эукариотический промотор GAPDH и распространяющуюся до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH.

Согласно некоторым вариантам реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, происходит из млекопитающего, например, эукариотический промотор GAPDH представляет собой промотор GAPDH млекопитающего, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше промотора GAPDH млекопитающего, используют, как описано в настоящем описании.

Согласно некоторым вариантам реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, происходит из грызуна или человека, например, эукариотический промотор GAPDH представляет собой промотор GAPDH грызуна или человека, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше промотора GAPDH грызуна или человека, используют, как описано в настоящем описании.

В предпочтительном варианте нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, выбрана из последовательности человеческого, крысиного или мышинного происхождения, в более предпочтительном варианте, человеческого или мышинного происхождения, наиболее предпочтительно, человеческого происхождения.

Согласно некоторым вариантам реализации нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH, функционально не связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета содержит сайт полиаденилирования. В предпочтительном варианте сайт полиаденилирования выбран из группы, состоящей из поли(A) SV40 и поли(A) BGH (бычий гормон роста).

Согласно некоторым вариантам реализации промотор и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид экспрессионной кассеты, функционально связаны.

Согласно некоторым вариантам реализации промотор экспрессионной кассеты выбран из группы, состоящей из промотора SV40, промотора tk человека, промотора MPSV (вирус миелопролиферативной саркомы), промоторов CMV (цитомегаловирус) мыши, CMV человека, CMV крысы, EF1альфа (фактор элонгации) человека, EF1альфа китайского хомяка, GAPDH человека, гибридных промоторов, включая промотор MYC, NYK и CX.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид, кодируемый экспрессионной кассетой, может представлять собой негликозилированный и гликозилированный полипептид. Гликозилированные полипептиды относятся к полипептидам, имеющим по меньшей мере одну олигосахаридную цепь.

Примерами негликозилированных белков являются, например, негликозилированные гормоны; негликозилированные ферменты; негликозилированные факторы роста семейства факторов роста нервов (NGF), семейства эпителиальных факторов роста (EGF) и факторов роста фибробластов (FGF) и негликозилированные рецепторы для гормонов и факторов роста.

Примерами гликозилированных белков являются гормоны и факторы, высвобождающие гормоны, факторы свертывания крови, антиагулирующие факторы, рецепторы для гормонов или факторов роста, нейротрофические факторы, цитокины и их рецепторы, Т-клеточные рецепторы, поверхностные мембранные белки, транспортные белки, хоминг-рецепторы, адрессины, регуляторные белки, антитела, химерные белки, такие как иммуноадгезины, и фрагменты любого из гликозилированных белков. В предпочтительном варианте, полипептид выбран из группы, состоящей из антител, фрагментов антител или производных антител (например, слитые белки с Fc и конкретные форматы антител, подобные биспецифичным антителам). Фрагмент антитела, используемый в настоящем описании, включает (i) домен, (ii) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL или CK и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, (iv) фрагмент dAb (Ward E.S. et al. (1989), Nature, 341(6242):544-6), который состоит из одного переменного домена, (v) фрагменты F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab, (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), где домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет двум доменам ассоциировать с образованием антигенсвязывающего сайта (Bird R.E. et al. (1988), Science, 242(4877):423-6; Huston J.S. et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(16):5879-83), (vii) "диатела" или "триотела", поливалентные или полиспецифичные фрагменты, сконструированные путем слияния генов (Holliger P. et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(14):6444-8; Holliger P. et al. (2000), Methods Enzymol, 326:461-79), (viii) scFv, диатело или доменное антитело, слитое с областью Fc, и (ix) scFv, слитый с таким же или другим антителом, но не ограничивается ими.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионная кассета дополнительно содержит элемент гена, выбранный из группы, состоящей из дополнительного промотора, энхансера, транскрипционных регуляторных элементов и селектируемого маркера, предпочтительно селектируемого маркера, ко-

который экспрессируется в животных клетках. Транскрипционные регуляторные элементы, например, представляют собой последовательности Козака или элементы терминатора транскрипции.

Согласно одному варианту реализации элемент гена представляет собой селектируемый маркер, в котором содержание сайтов CpG, содержащихся в полинуклеотидной последовательности, кодирующей селектируемый маркер, составляет 45 или меньше, предпочтительно 40 или меньше, более предпочтительно 20 или меньше, в частности 10 или меньше, более конкретно 5 или меньше, наиболее конкретно 0 (сайты CpG были полностью удалены).

Согласно другому аспекту настоящего описания предложен экспрессионный вектор, предпочтительно экспрессионный вектор млекопитающего, содержащий экспрессионную кассету, описанную выше. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионный вектор содержит по меньшей мере две отдельные транскрипционные единицы. Экспрессионный вектор с двумя отдельными транскрипционными единицами также называется вектором с двумя генами. Его примером является вектор, в котором первая транскрипционная единица кодирует тяжелую цепь антитела или его фрагмент, и вторая транскрипционная единица кодирует легкую цепь антитела. Другим примером является вектор с двумя генами, в котором две транскрипционные единицы кодируют две разные субъединицы белка, такого как фермент. Однако, также возможно, что экспрессионный вектор согласно настоящему изобретению содержит более двух отдельных транскрипционных единиц, например, три, четыре или даже более отдельных транскрипционных единиц, каждая из которых содержит отличающуюся нуклеотидную последовательность, кодирующую отличающуюся полипептидную цепь. Его примером является вектор с четырьмя отдельными транскрипционными единицами, каждая из которых содержит отличающуюся нуклеотидную последовательность, кодирующую одну субъединицу фермента, состоящего из четырех разных субъединиц.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионный вектор дополнительно содержит элемент гена, выбранный из группы, состоящей из дополнительного промотора, энхансера, транскрипционных регуляторных элементов, точки начала репликации и селектируемого маркера.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионный вектор дополнительно содержит точку начала репликации и селектируемый маркер, где содержание сайтов CpG, содержащихся в полинуклеотидной последовательности экспрессионного вектора, кодирующей точку начала репликации и селектируемый маркер, составляет 200 или меньше, предпочтительно 150 или меньше, в частности 100 или меньше, более конкретно 50 или меньше, наиболее конкретно 30 или меньше.

Любой традиционно используемый селективный маркер, такой как тимидинкиназа, дигидрофолат-редуктаза (DHFR), пиромидин, неомицин или глутаминсинтетаза (GS), можно использовать для экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте, экспрессионные векторы согласно изобретению также могут содержать ограниченное число полезных рестрикционных сайтов для вставки экспрессионной кассеты для выделения гетерологичного белка согласно настоящему изобретению. При использовании, в частности только для временной/эпизодической экспрессии, экспрессионные векторы согласно изобретению могут дополнительно содержать точку начала репликации, такую как репликатор oriP вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ) или вируса SV40 для автономной репликации/эпизодного поддержания в эукариотических клетках-хозяевах, но могут быть лишены селектируемого маркера. Временная экспрессия в клетке, не содержащей уместных факторов для облегчения репликации вектора, также является возможной. Экспрессионный вектор, несущий экспрессионную кассету, может дополнительно содержать экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный маркер, экспрессионную кассету, кодирующую нкРНК (некодирующая РНК), экспрессионную кассету, кодирующую антиапоптотический белок, или экспрессионную кассету, кодирующую белок, увеличивающий способность секреторного пути.

В другом аспекте согласно настоящему описанию предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше и/или ниже эукариотического промотора GAPDH,

б) промотор,

в) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,

г) сайт полиаденилирования,

д) энхансер,

е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH4; или

а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше и/или ниже эукариотического промотора GAPDH,

б) энхансер,

в) промотор,

г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,

д) сайт полиаденилирования,

е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше эука-

риотического промотора GAPDH; или

- а) энхансер,
- б) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше и/или ниже эукариотического GAPDH,
- в) промотор,
- г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
- д) сайт полиаденилирования,
- е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше эукариотического GAPDH,

где включение энхансера является необязательным, и где полинуклеотид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, охватывающей район от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, где положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов, и где нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического промотора GAPDH, начинается в пределах области, охватывающей район от около 5'-конца эукариотического промотора GAPDH до положения нуклеотида около -3500, где положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и где длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше эукариотического промотора GAPDH, составляет от около 100 до около 15000 нуклеотидов, при условии, что, если а) или б) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH, е) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического GAPDH, и если а) или б) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического GAPDH, е) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего описания предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

- а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH,
- б) промотор,
- в) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
- г) сайт полиаденилирования,
- д) энхансер,
- е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH, где включение энхансера является необязательным.

Согласно другому аспекту настоящего описания предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

- а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического промотора GAPDH,
- б) энхансер,
- в) промотор,
- г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
- д) сайт полиаденилирования,
- е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического GAPDH, где необязательно включение энхансера.

Согласно другому аспекту настоящего описания предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

- а) энхансер,
- б) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH,
- в) промотор,
- г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
- д) сайт полиаденилирования,
- е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического GAPDH,

где является необязательным включение энхансера.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

- а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH,

б) промотор,
 в) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
 г) сайт полиаденилирования,
 д) энхансер,
 е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH, где необязательно включение энхансера.

Согласно другому аспекту настоящего описания предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

а) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического промотора GAPDH,
 б) энхансер,
 в) промотор,
 г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
 д) сайт полиаденилирования,
 е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH, где необязательно включение энхансера.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен экспрессионный вектор, который содержит по порядку следующее:

а) энхансер,
 б) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже эукариотического GAPDH,
 в) промотор,
 г) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид,
 д) сайт полиаденилирования,
 е) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше эукариотического GAPDH,

где включение энхансера является необязательным.

Нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше эукариотического GAPDH, энхансер, промотор, полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, сайт полиаденилирования и нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже эукариотического промотора GAPDH экспрессионных векторов, представляют собой, например, такие, как описано выше.

Согласно другому аспекту настоящего описания предложена клетка-хозяин, содержащая экспрессионную кассету или экспрессионный вектор, описанный выше. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую или не являющуюся человеческой клетку. Предпочтительные клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих. Предпочтительные примеры клеток-хозяев млекопитающих включают клетки почки эмбриона человека (Graham F.L. et al., J. Gen. Virol. 36:59-74), фибробласты человека MRC5, клетки меланомы человека 983M, клетки почки собаки MDCK, RF культивируемые фибробласты легкого крысы, выделенные из крыс линии Спрэг Доули, клетки меланомы мыши B16BL6, клетки мастоцитомы мыши P815, клетки аденокарциномы молочной железы мыши MTI A2, клетки PER:C6 (Leiden, Нидерланды) и клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клеточные линии (Puck et al., 1958, J. Exp. Med. 108:945-955), но не ограничиваются ими.

Согласно определенному предпочтительному варианту реализации клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка (CHO) или клеточную линию. Подходящие клеточные линии CHO включают, например, CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12 или dhfr- CHO клеточную линию DUK-BII (Chasin et al., PNAS 77, 1980, 4216-4220), DUXBI 1 (Simonsen et al., PNAS 80, 1983, 2495-2499) или CHO-K1SV (Lonza, Basel, Швейцария).

Согласно другому аспекту настоящего описания предложен способ *in vitro* экспрессии полипептида, включающий трансфекцию клетки-хозяина экспрессионной кассетой или экспрессионным вектором, как описано выше, и выделение полипептида. Полипептид в предпочтительном варианте представляет собой гетерологичный, в более предпочтительном варианте человеческий полипептид.

Для трансфицирования клетки-хозяина экспрессионной кассетой или экспрессионным вектором согласно настоящему изобретению можно использовать любую методику трансфекции, например методики, хорошо известные в данной области, например электропорацию, совместное осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию с использованием ДЭАЭ-декстрана (диэтиламиноэтилдекстран), липофекцию, если это целесообразно для данного типа клетки-хозяина. Следует отметить, что клетку-хозяина, трансфицированную экспрессионной кассетой или экспрессионным вектором согласно настоящему изобретению, нужно конструировать в виде временно или стабильно трансфицированной клеточной линии. Таким образом, согласно настоящему изобретению экспрессионную кассету или экспрессионный вектор можно поддерживать эпизомально, т.е. в форме временной трансфекции, или можно стабильно включать в геном клетки-хозяина, т.е. в форме стабильной трансфекции.

Временная трансфекция характеризуется отсутствием применения какого-либо давления отбора в

отношении вектора, несущего селективный маркер. В экспериментах по временной трансфекции, которые обычно длятся от 2 вплоть до 10 дней после трансфекции, трансфицируемую экспрессионную кассету или экспрессионный вектор поддерживают в виде эпизомных элементов и еще не включают в геном. Другими словами, трансфицируемая ДНК обычно не включается в геном клетки-хозяина. Клетки-хозяева имеют тенденцию терять трансфицированную ДНК и перерастают трансфицированные клетки в популяции при культивировании временно трансфицируемого пула клеток. В связи с этим, экспрессия является самой сильной в период, следующий непосредственно после трансфекции, и снижается со временем. В предпочтительном варианте под временным трансфектантом согласно настоящему изобретению понимают клетку, которая поддерживается в клеточной культуре в отсутствии давления отбора вплоть до временного периода от 2 до 10 дней после трансфекции.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения клетку-хозяина, например клетку-хозяина СНО, стабильно трансфицируют экспрессионной кассетой или экспрессионным вектором согласно настоящему изобретению. Стабильная трансфекция означает, что заново вводимая чужеродная ДНК, такая как векторная ДНК, становится включенной в геномную ДНК, обычно в результате случайных, негомологичных случаев рекомбинации. Число копий векторной ДНК и наряду с этим количество продукта гена могут быть увеличены путем отбора клеточных линий, в которых последовательности вектора были амплифицированы после включения в ДНК клетки-хозяина. В связи с этим возможно, что такая стабильная интеграция приводит, при воздействии дополнительного повышения давления отбора во время амплификации гена, к удвоению малых хромосом в клетках СНО. Более того, стабильная трансфекция может приводить к потере частей векторной последовательности, непосредственно не связанных с экспрессией рекомбинантного продукта гена, таких как, например, области, регулирующие число копий бактерий, представленные в избыточном количестве при интеграции в геном. Соответственно, трансфицированная клетка-хозяин включала в геном по меньшей мере часть или разные части экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора, описанного выше, для экспрессии гетерологичного полипептида из клетки-хозяина млекопитающего, в частности для применения экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора, описанного выше, для экспрессии *in vitro* гетерологичного пептида из клетки-хозяина млекопитающего.

Экспрессию и выделение белка можно проводить согласно способам, известным специалисту в данной области техники.

Для экспрессии полипептида используют нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора, описанных выше, и клетку-хозяина, описанную выше, и они обычно имеют одно происхождение. Неожиданно было обнаружено, что получают повышение уровня экспрессии в том случае, если нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора, и клетка-хозяин имеют разное происхождение, например, если в клетках СНО используют последовательности ДНК человека, расположенные ниже и/или выше эукариотического промотора GAPDH.

Согласно другому аспекту настоящего описания предложено применение экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора, описанных выше, для получения лекарственного средства для лечения расстройства.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены экспрессионная кассета или экспрессионный вектор, описанные выше, для применения в качестве лекарственного средства для лечения расстройства.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены экспрессионная кассета или экспрессионный вектор, описанные выше, для применения в генной терапии.

Примеры

Пример 1. Клонирование экспрессионных векторов.

I. Материалы и методы.

I.1. Конструкции-плазмиды.

I.1.1. Чашки со средой LB.

500 мл воды смешивали и кипятили с 16 г агаризованной средой LB (лизогенный бульон) (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) (1 л LB содержит 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 10 г NaCl). После охлаждения к раствору, который затем помещали в чашки, добавляли соответствующий антибиотик (чашки с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и чашки с канамицином в концентрации 50 мкг/мл).

I.1.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Все ПЦР проводили, используя 1 мкл dNTP (10 мМ для каждого dNTP; Invitrogen, Carlsbad, CA, США), 2 единицы ДНК-полимеразы Phusion® (Finnzymes Oy, Espoo, Финляндия), 25 нмоль праймера А (Mycrosynth, Balgach, Швейцария), 25 нмоль праймера В (Mycrosynth, Balgach, Швейцария), 10 мкл буфера 5X HF (7,5 мМ MgCl₂, Finnzymes, Espoo, Финляндия), 1,5 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, Finn-

zymes, Espoo, Финляндия) и 1-3 мкл матрицы (1-2 мкг) в 50 мкл конечного объема. Все используемые праймеры перечислены в табл. 1.

ПЦР начинались с первоначальной денатурации при 98°C в течение 3 мин, за которой следовали 35 циклов с денатурацией 30 с при 98°C, отжигом 30 с при праймер-специфичной температуре (согласно содержанию CG) и элонгацией 2 мин при 72°C. Финальную элонгацию при 72°C в течение 10 мин проводили перед охлаждением и выдерживанием при 4°C.

Таблица 1: Краткое описание праймеров, используемых в ПЦР: GAPDH: последовательность глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы, 5': последовательность в восходящем направлении, 3': последовательность в нисходящем направлении. "T" (подчеркнуто) в праймере GlnPr1172 вводили для того, чтобы избежать образования димеров праймеров.

Праймер	Последовательность праймеров	Аmplified последовательность	Seq ID
GlnPr 1171	ATTATTCGCGATGGCTCCTGGCA TCTCTGGGACCGAGGC	5' GAPDH	SEQ ID No: 1
GlnPr 1172	ATCGTCGCGAAGCTTGAGATTGT CCAAGCAGGTAGCCAG		SEQ ID No: 2
GlnPr 1173	AGCAAGTACTTCTGAGCCTTCA GTAATGGCTGCCTG	3'GAPDH	SEQ ID No: 3
GlnPr 1174	TGGCAGTACTAAGCTGGCACCA CTACTTCAGAGAACAAG		SEQ ID No: 4

1.1.3. Рестрикционное расщепление.

Для всех рестрикционных расщеплений примерно 1 мкг плазмидной ДНК (количественное определение проводили с использованием NanoDrop, Спектрофотометр ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, США)) смешивали с 10-20 единицами каждого фермента, 4 мкл соответствующего 10X NEBuffer (NEB, Ipswich, MA, США) и объем доводили до 40 мкл стерильной H₂O. Без дополнительной индикации смеси для расщепления инкубировали 1 ч при 37°C.

После каждого препаративного расщепления скелета добавляли 1 единицу телячьей кишечной щелочной фосфатазы (CIP; NEB, Ipswich, MA, США) и смесь инкубировали 3 мин при 37°C. В случае, если расщепление проводили в NEBuffer 3 (NEB, Ipswich, MA, США), буфер заменяли на NEBuffer 4 перед добавлением CIP, так как данный фермент обладает сильной активностью в данной буфере и может также расщеплять некоторые нуклеотиды на внешних концах.

1.1.4. Очистка ПЦР и электрофорез в агарозном геле.

1.1.4.1. Очистка ПЦР.

Для обеспечения расщепления все фрагменты ПЦР очищали перед рестрикционными расщеплениями, используя набора Macherey Nagel Extract II (Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария), придерживаясь руководства производителя с использованием 40 мкл элюирующего буфера. Данный протокол также использовали при замене буферов образцов ДНК.

1.1.4.2. Выделение ДНК

Для гель-электрофореза получали 1%-ные гели, используя агарозу UltraPure™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) и трис-ацетатный буфер 50X, содержащий ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) (TAE, pH 8,3; Bio RAD, Munich, Германия). Для окрашивания ДНК к 100 мл агарозного геля добавляли Gel Red Dye (Biotum, Hayward, CA, США). В качестве маркера размера использовали 2 мкг ДНК-маркера 1 т.п.н (тысяча пар нуклеотидов) (NEB, Ipswich, MA, США). Электрофорез проводили в течение примерно 1 ч при напряжении 125 В. Интересующие полосы вырезали из агарозного геля и очищали, используя набор Extract II (Macherey-Nagel, Oensingen, Швейцария), придерживаясь руководства производителя с использованием 40 мкл элюирующего буфера.

1.1.5. Лигирование.

Для каждого лигирования 4 мкл вставки смешивали с 1 мкл вектора, 400 единицами лигазы (T4 ДНК-лигаза, NEB, Ipswich, MA, США), 1 мкл 10X буфера для лигазы (буфер для T4 ДНК-лигазы; NEB, Ipswich, MA, США) в 10 мкл объеме. Смесь инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре.

1.1.6. Трансформация компетентных бактерий продуктами лигирования.

Для клонирования pGLEX41-[REP] и для конструкций, созданных с помощью вектора pCR-Blunt,

которые содержат стандартную точку начала репликации, использовали TOP 10 (компетентные клетки *E.coli* One Shot® TOP 10; Invitrogen, Carlsbad, CA, США).

Для инициации репликации плазмиды, содержащей точку начала репликации R6K, требуется экспрессия белка π , кодируемого последовательностью *pir*. Белок π экспрессируется компетентными клетками *E.coli* One Shot® PIR1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Данные бактерии используют для всех векторов, содержащих последовательность R6K.

Для трансформации компетентных бактерий продуктом лигирования 25-50 мкл бактерий размораживали на льду в течение 5 мин. Затем 3-5 мкл продукта лигирования добавляли к компетентным клеткам и инкубировали в течение 20-30 мин на льду перед тепловым шоком в течение 1 мин при 42°C. Затем в пробирку добавляли 500 мкл среды S.O.C. (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C при перемешивании. Наконец, бактерии помещали на чашку с LB, с ампициллином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Для клонирования в векторы pCR-Blunt использовали чашки с канамицином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США).

I.1.7. Получение плазмиды в небольшом (мини-преп) и среднем масштабе (мидипреп).

I.1.7.1. Мини-препаративное выделение.

Во время мини-препаративного выделения колонии трансформированных бактерий выращивали в течение 6-16 ч в 2,5 мл LB и ампицилина или канамицина при 37°C, 200 об/мин. ДНК выделяли с помощью набора для выделения плазмиды для *E.coli* (QuickPure, Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария), следуя предложенному руководству.

Плазмидную ДНК из образцов мини-препаративного выделения количественно определяли один раз на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, США), измеряя поглощение при 260 нм и оценивая соотношение OD_{260 нм} (оптическая плотность)/OD_{280 нм}, которое должно находиться в диапазоне 1,8-2. Контрольное расщепление проводили перед отправлением образца в Fastens SA (Женева, Швейцария) для подтверждения последовательности.

Для выделения ВАС (бактериальные искусственные хромосомы) использовали набор QuickPure (Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария) с модификацией протокола, представленной ниже: 10 мл LB и хлорамфеникола (12,5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) засеивали бактериями, содержащими вектор pBACe3.6. После инкубации на качающейся платформе при 37°C в течение ночи культуру центрифугировали в течение 5 мин при 133000 об/мин перед ресуспендированием в 500 мкл буфера A1. Добавляли 500 мкл лизирующего буфера A2, и раствор инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем его нейтрализовали 600 мкл буфера A3 и центрифугировали в течение 10 мин при 13300 об/мин. Супернатант загружали на колонку, и далее, начиная с данной стадии, использовали стандартный протокол набора для мини-препаративного выделения плазмиды QuickPure.

I.1.7.2. Мидипрепаративное выделение.

Для мидипрепаративного выделения трансформированные бактерии выращивали при 37°C в течение ночи в 200-400 мл LB и ампицилина (или канамицина). Затем культуру центрифугировали в течение 20 мин при 725 g и плазмиду выделяли с использованием коммерческого набора (NucleoBond Xtra Midi; Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария), придерживаясь протокола выделения плазмиды в низкой концентрации, предложенного в руководстве производителя.

Плазмидную ДНК после мидипрепаративного выделения количественно определяли три раза с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000, подтверждали рестрикционным расщеплением и, наконец, отправляли на секвенирование (Fastens SA, Женева, Швейцария).

II. Результаты и обсуждение.

II.1. Клонирование областей ДНК, расположенных выше и ниже экспрессионной кассеты GAPDH (5' и 3' GAPDH).

ВАС клон RPCIB753F11841Q заказывали в Imagene (Берлин, Германия). Данный клон содержит последовательность GAPDH человека в каркасе вектора pBACe3.6, содержащем ген устойчивости к хлорамфениколу. После выделения ДНК в результате мини-препаративного выделения концентрацию вектора определяли с помощью Nanodrop, как 27 нг/мкл.

Последовательности ДНК, непосредственно окружающие экспрессионную кассету GAPDH выше промотора и ниже сайта полиаденилирования, амплифицировали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы 27 нг очищенного клона RPCIB753F11841Q. Фрагмент 3 т.п.н., расположенный выше промотора, амплифицировали с праймерами GlnPr1171 (SEQ ID NO: 1) и GlnPr1172 (SEQ ID NO: 2) с получением ампликона с SEQ ID NO: 5. Так как праймер GlnPr1172 (SEQ ID NO: 2) несет замену основания (G на T) относительно матричной последовательности, все последовательности, полученные в результате данной реакции ПЦР, будут также нести данную замену основания. Замена локализована в положении -3721 относительно точки начала транскрипции гена GAPDH ((п.н.) 812 SEQ ID NO: 17, положение 23 относительно начала SEQ ID NO: 5). Фрагмент 3 т.п.н., расположенный ниже сайта полиаденилирования, амплифицировали с праймерами GlnPr1173 (SEQ ID NO: 3) и GlnPr1174 (SEQ ID NO: 4) с получением ампликона с SEQ ID NO: 6 (табл. 1). Температура отжига, используемая для данных ПЦР, составляла 72°C.

Фрагменты 5' и 3' GAPDH (SEQ ID NO: 5 и 6) клонировали в pCR-Blunt, коммерчески доступный

вектор для клонирования ПЦР-продукта (pCR-Blunt, набор для клонирования PCR Zero Blunt, Invitrogen). Компетентные бактерии TOP10 трансформировали продуктами лигирования и помещали на чашки с агаризованной LB с канамицином. Колонии амплифицировали, и плазмиды выделяли путем мини-преп (мини-препаративное выделение плазмидной ДНК). Контрольные расщепления проводили для идентификации позитивных клонов, содержащих конструкции pCR-Blunt-5'GAPDH и pCR-Blunt-3'GAPDH.

II.2. Получение фрагмента ДНК, кодирующего репортерные белки GFP и рекомбинантное моноклональное антитело IgG1 (LC-IRES-HC-IRES-GFP).

Репортерная конструкция (REP), используемая в настоящей работе, состояла из полицистронного гена: легкая цепь (LC) моноклонального антитела IgG1-IRES-тяжелая цепь (HC) моноклонального антитела IgG1-IRES-зеленый флуоресцентный белок (GFP). Наличие участков внутренней посадки рибосомы (IRES), происходящих из вируса энцефаломиокардита (Gurtu et al., Biochem Biophys Res Commun.; 229(1): 25-298, 1996)), делает возможной трансляцию трех пептидов легкой цепи (LC) моноклонального антитела IgG1, тяжелой цепи (HC) моноклонального антитела IgG1 и GFP (фиг. 1). В связи с этим трансфицированные клетки будут секретировать моноклональное антитело IgG1 и накапливать внутриклеточный GFP зависимым образом. Однако полицистронные РНК не являются обычным явлением в эукариотических клетках, и их трансляция не является очень эффективной, что приводит к относительно низким титрам IgG1 и экспрессии GFP.

Вектор, содержащий конструкцию REP, расщепляли, используя рестриктазы NheI и BstBI (BstBI используют при 65°C). Фрагмент REP, содержащий экспрессионную конструкцию, вырезали, очищали и использовали для дальнейших этапов клонирования.

II.3. Клонирование экспрессионных векторов.

Вектор pGLEX41, экспрессионный вектор, полученный из pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, США), использовали для получения стабильной клеточной линии. Его использовали в качестве исходного каркаса, который модифицировали с образованием вторично произведенных векторов А и В с последовательностями GAPDH и без них. Для всех векторов использовали одну и ту же комбинацию промотор-интрон (mCMV и донорно-акцепторный фрагмент, кодирующий первый интрон (IgDA)) (Gorman et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:5459-5463).

Клонирование промежуточного вектора pGLEX41-HM-MCS-amp^rA.

Разработку нового поколения векторов начинали с pGLEX41. Данный вектор резали, используя рестриктазы NruI и BspHI для высвобождения кассеты устойчивости к ампициллину. Фрагмент каркаса обрабатывали CIP и очищали с помощью гель-электрофореза. Фрагмент ДНК, кодирующий вариант гена устойчивости к ампициллину (включая промотор bla) с оптимизированным кодоном (для экспрессии в E.coli) заказывали в GeneArt. Вставку вырезали из клонирующего вектора GeneArt #1013237 с использованием рестриктаз NruI и BspHI (такие же ферменты, как используемые для каркаса), очищали и клонировали в каркас. Образцы мини-преп анализировали путем рестрикционного расщепления. Клон pGLEX41-HM-MCS-amp^rA#2 имел ожидаемый рестрикционный профиль, и включение правильного фрагмента подтверждали секвенированием.

Клонирование промежуточного вектора pGLEX41-MCS-R6K-amp^rA.

Для замены точки начала репликации pUC вектора pGLEX41-HM-MCS-amp^rA#2 вектор расщепляли, используя PvuI и BspHI. Фрагмент каркаса обрабатывали CIP и очищали. Новый фрагмент-вставка содержит точку начала репликации R6K и модифицированную последовательность поли(A) SV40 в качестве части экспрессионной кассеты. Ненужные бактериальные или вирусные каркасные последовательности вокруг поли(A) SV40 устраняли (см. ниже, табл. 2). Фрагмент-вставку заказывали в GeneArt; его вырезали из клонирующего вектора GeneArt #1013238, используя ферменты PvuI и BspHI (такие же, как использовали для каркаса), очищали и клонировали в каркасный фрагмент. Получали образцы мини-преп и их подтверждали анализом последовательности. Клон pGLEX41-MCS-R6K-amp^rA#1 имел правильную последовательность.

Таблица 2: Содержание СрG в разных векторах.

	Содержание СрG в экспрессионных векторах		
	pGLEX41	Векторы с оптимизированным кодоном: "А"	Векторы со сниженным содержанием СрG: "В"
Устойчивость к ампициллину	49	43	19
Устойчивость к пиромидину	93	36	1
Устойчивость к генетицину	74	51	0
Точка начала репликации	45	9	9
Итого:	261	139	29

Клонирование промежуточного вектора pGLEX41-MCS-R6K-ampⁱB.

Вектор pGLEX41- MCS-R6K-ampⁱA#1 раскрывали с использованием рестрикции BspHI и обрабатывали CIP для высвобождения гена устойчивости к ампициллину. Новый фрагмент-вставка содержит ген устойчивости к ампициллину, с оптимизированным кодоном для экспрессии в E.coli, а все последовательности СрG, которые можно было устранить в результате использования альтернативного кодона, заменяли (см. табл. 2). Данный фрагмент заказывали в GeneArt. Для высвобождения фрагмента-вставки клонирующий вектор GeneArt #1016138 расщепляли с использованием BspHI. После очистки как фрагмента-вставки, так и каркасного фрагмента с помощью гель-электрофореза их лигировали и ими трансформировали бактерии PIR1. Образцы мини-преп прямо отправляли на секвенирование. pGLEX41-R6K-MCS-ampⁱB#1 имеет правильную последовательность, и его использовали для дальнейших этапов клонирования.

Клонирование репортерной конструкции в экспрессионные векторы, полученные из pGLEX41.

Для клонирования репортерной конструкции REP в экспрессионные векторы pGLEX41- MCS-R6K-ampⁱA и pGLEX41-MCS-R6K-ampⁱB, векторы резали, используя рестриктазы NheI и ClaI. Экспрессионный вектор pGLEX41-HM-MCS раскрывали, используя рестриктазы NheI и BstBI (при 65°C). Все каркасы векторов обрабатывали CIP после расщепления и очищали с помощью гель-электрофореза. Каркасы лигировали с фрагментом NheI/BstBI (BstBI совместима с ClaI), кодирующим репортерную конструкцию REP. Компетентные бактерии TOP 10 или PIR1 трансформировали продуктами лигирования и помещали на чашки с агаризованной LB с ампициллином. Колонии амплифицировали, и плазмиды выделяли с помощью мини-преп. Позитивные колонии можно было идентифицировать путем рестрикционного расщепления образцов мин-ипреп и последующего подтверждения последовательности Fastens SA.

Добавление фланкирующих последовательностей GAPDH в экспрессионные векторы, полученные из pGLEX41.

Все рестрикционные расщепления согласно данному параграфу проводили в конечном объеме 80 мкл и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Последовательность 5' GAPDH (SEQ ID NO: 7) вырезали из pCR-blunt-5'GAPDH, используя рестриктазу NruI, и лигировали в экспрессионные векторы pGLEX41-R6K-ampⁱA-[REP] и pGLEX41-R6K-ampⁱB-[REP], которые линеаризовали, используя NruI, и обрабатывали CIP для того, чтобы избежать повторной циркуляризации. После амплификации колоний PIR1 (полученных в результате трансформации продуктами лигирования) образцы мини-преп анализировали путем рестрикционного расщепления. Клоны pGLEX41-R6K-ampⁱA-5'GAPDH-[REP] #2 и pGLEX41-R6K-ampⁱB-5'GAPDH-[REP] #1, показывающие полосы ожидаемого размера в рестрикционном анализе, затем подтверждали секвенированием и использовали на дальнейших этапах клонирования. Данные новые векторы затем раскрывали с помощью ScaI и обрабатывали CIP. Фрагмент GAPDH3' (SEQ ID NO: 8) вырезали из pCR-Blunt-3'GAPDH, используя тот же фермент, и лигировали в два каркаса для образования экспрессионных векторов pGLEX41-R6K-ampⁱA-GAPDH-[REP] и pGLEX41-R6K-ampⁱB-GAPDH-[REP].

Контрольное расщепление клонов pGLEX41-R6K-ampⁱA-GAPDH-[REP] #2 и pGLEX41-R6K-ampⁱB-GAPDH-[REP] #8 в рестрикционном анализе демонстрировало полосы ожидаемого размера. Вставку фрагмента 3'GAPDH в правильной ориентации затем подтверждали секвенированием (Fastens).

II.4. Клонирование векторов устойчивости.

Начальной точкой для клонирования векторов устойчивости являлся вектор pGLEX-MCS-R6K-amp^rA#1. Так как для экспрессии генов устойчивости достаточно слабого промотора, промотор mCMV заменяли промотором SV40. Гены, кодирующие устойчивость, заказывали в GeneArt SA (Регенсбург, Германия) и либо оптимизировали для экспрессии в китайском хомяке (пуromицин: pu^roA и неомицин: neoA), либо у них снижали содержание CpG путем использования селективного кодона (пуromицин: pu^roB и неомицин: neoB).

Клонирование pGLEX-R6K-Amp^rA-Pu^roA/Pu^roB.

Для клонирования устойчивости к пуromицину в экспрессионной кассете вектор pGLEX41-MCS-R6K-amp^rA#1 раскрывали, используя рестриктазы NruI и XbaI с последующей обработкой CIP. Фрагмент-вставку заказывали в GeneArt, и он был представлен в виде вставки в клонирующем векторе GeneArt #1013239. Он содержит промотор SV40 и ген устойчивости к пуromицину с оптимизированным кодоном (для использования кодона клеток CHO). Вставку вырезали из клонирующего вектора GeneArt, используя ферменты NruI и XbaI (такие же, как использовались для каркаса), очищали и клонировали в каркасный фрагмент. Получали образцы мини-преп и их анализировали путем рестрикционного расщепления. Клон pGLEX-MCS-R6K-amp^rA-pu^roA#1 демонстрировал правильный профиль, и его можно было подтвердить секвенированием.

Данный вектор использовали для клонирования вектора pGLEX-MCS-R6K-amp^rA-pu^roB путем замены кодирующей области на ген устойчивости к пуromицину, при том, что промотор SV40 остается. Новый фрагмент-вставка содержит кодон-оптимизированный вариант гена устойчивости к пуromицину, где были заменены все последовательности CpG, которые можно было устранить за счет использования альтернативного кодона. Фрагмент заказывали GeneArt и переносили в клонирующий вектор # 1016139. Для высвобождения фрагмента-вставки вектор GeneArt расщепляли, используя рестриктазы XbaI и NotI. Фрагмент-вставку очищали путем гель-электрофореза и клонировали в каркас pGLEX-MCS-R6K-amp^rA-pu^roA, после высвобождения открытой рамки считывания гена устойчивости к пуromицину путем рестрикционного расщепления, используя XbaI и NotI с последующей обработкой CIP. Полученный вектор pGLEX-MCS-R6K-amp^rA-pu^roB#1 прямо подтверждали с помощью анализа последовательности.

Клонирование векторов pGLEX-R6K-amp^rA-NeoA и pGLEX-R6K-amp^rA-NeoB.

Для клонирования гена устойчивости к неомицину в экспрессионную кассету вектор pGLEX-R6K-pu^roA#1 раскрывали, используя рестриктазы XbaI и NotI с последующей обработкой CIP. Фрагменты-вставки заказывали в GeneArt, и они были представлены в виде вставок в клонирующие векторы GeneArt #1013242 (neoA) и #1026894 (neoB). Они содержат ген устойчивости к неомицину с оптимизированным кодоном для использования кодона клеток CHO и вариант гена устойчивости к неомицину со сниженным содержанием CpG соответственно. Вставки вырезали из клонирующих векторов GeneArt, используя ферменты XbaI и NotI (такие же, как использовались для каркаса), очищали и клонировали в каркасный фрагмент. Получали образцы мини-преп, и последовательности клонов подтверждали секвенированием.

Клонирование векторов pGLEX-R6K-amp^rB-NeoB and pGLEX41-R6K-amp^rB-pu^roB:

Вектор pGLEX41-R6K-pu^roB#1 раскрывали, используя рестриктазу BspHI, и затем обрабатывали CIP. Фрагмент-вставка содержит ген устойчивости к ампициллину, у которого был оптимизирован кодон для экспрессии в E.coli, в то время как были заменены последовательности CpG, которые можно было устранить за счет использования альтернативного кодона. Данный фрагмент заказывали в GeneArt, и он поступал в клонирующем векторе #1016138. Для высвобождения фрагмента-вставки клонирующий вектор GeneArt расщепляли, используя BspHI. После очистки как вставки, так и каркасного фрагмента с помощью гель-электрофореза их лигировали, и ими трансформировали бактерии PIR1. Образцы мини-преп прямо отправляли на секвенирование, и их последовательности можно было подтвердить (pGLEX41-amp^rB-R6K-pu^roB#1).

Клонирование, приводящее к получению вектора pGLEX-R6K-neoB-amp^rB, проводили, раскрывая pGLEX-R6K-neoB-amp^rA с использованием рестриктаз BspHI для создания каркасного фрагмента. Расщепление pGLEX-R6K-amp^rB-hygroB, используя такую же комбинацию рестриктаз, давало фрагмент-вставку, кодирующую amp^rB. Вставку amp^rB клонировали в каркас pGLEX-R6K-neoB-amp^rA.

II.5 Добавление последовательностей, расположенных выше и ниже гена GAPDH человека, в векторы устойчивости.

Вектор pCR-blunt-5'GAPDH расщепляли NruI для получения вставки 5'GAPDH (3164 п.н.). Векторы, кодирующие гены устойчивости, расщепляли NruI, затем обрабатывали CIP (фосфатаза кишечника теленка, NEB, Ipswich, MA) для получения каркасных фрагментов. Четыре разных каркасных фрагмента (pGLEX-R6K-neoA-amp^rA, pGLEX-R6K-neoB-amp^rB, pGLEX-R6K-pu^roA-amp^rA и pGLEX-pu^roB-amp^rB) лигировали со вставкой 5'GAPDH 3164 п.н., и ими трансформировали компетентные бактерии PIR1. Рестрикционное расщепление образцов мини-преп с использованием ApaI делало возможной идентификацию клонов pGLEX-R6K-neoB-amp^rB-5'GAPDH#5, pGLEX-R6K-neoA-amp^rA-5'GAPDH #6, pGLEX-R6K-pu^roA-amp^rA-5'GAPDH #16 и pGLEX-pu^roB-amp^rB-5'GAPDH#5.

Данные промежуточные векторы затем разрезали рестриктазой ScaI и обрабатывали CIP для получения каркасов для лигирования. Вектор, несущий второй фрагмент-вставку, pCR-Blunt-3'GAPDH, разре-

зали, используя ScaI для высвобождения фрагмента-вставки (3224 п.н.) фланкирующей области, расположенной ниже GAPDH. Четыре разные каркасные молекулы лигировали с очищенным фрагментом-вставкой 3224 п.н., и ими трансформировали компетентные клетки PIR1. Образцы мини-преп анализировали путем рестрикционного расщепления. Клоны, демонстрирующие рестрикционные фрагменты ожидаемой длины, представляли собой pGLEX-R6K-neoB-ampiB-GAPDH #8, pGLEX-R6K-neoA-ampiA-GAPDH #1, pGLEX-R6K-puroA-ampiA-GAPDH #1 и pGLEX-puroB-ampiB-GAPDH #4. Затем клонов подтверждали секвенированием (Fastens, Женева, Швейцария).

II.1.5. Мидипрепаративные выделения плазмид, клонированных для трансфекции

Для получения достаточных количеств плазмид, проводили мини-преп (мидипрепаративные выделения плазмидной ДНК) с использованием набора Macherey Nagel (NucleoBond Xtra Midi; Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария). После подтверждения путем рестрикционного расщепления и секвенирования плазмиды линейаризовали и использовали для трансфекции в клетках CHO-S. В табл. 3 приведены концентрации партий плазмидной ДНК, полученных при мидипрепаративных выделениях, препаратов линейаризованной ДНК, которые были получены для трансфекции, ферменты, использованные для линейаризации, и файлы с последовательностями из Fastens SA, подтверждающие идентичность, и информация о последовательности соответствующей плазмиды. Все последовательности образцов мидипреп подтверждали секвенированием перед их использованием для трансфекций.

Таблица 3: Краткое описание клонированных плазмид. Концентрация мидипреп-ДНК и линейаризованной мини-преп-ДНК (с соответствующим ферментом). Номер GSC кодирует соответствующую плазмиду и дает возможность идентифицировать соответствующие файлы с секвенированными последовательностями.

Плазмиды	Конц. мидипреп (мкг/мл)	Фермент для линейаризации	Конц. линейаризованных плазмид (мкг/мл)	Код плазмиды от Glenmark
pGLEX41-R6K-AmpiA-[REP]-GAPDH	1538	EcoRV	1019	GSC 2774
pGLEX41-R6K-AmpiB-[REP]-GAPDH	1243	EcoRV	1233	GSC 2775
pGLEX-R6K-AmpiA-neoA-GAPDH	890	AseI	766	GSC 2776
pGLEX-R6K-AmpiB-neoB-GAPDH	594	AseI	979	GSC 2777
pGLEX-R6K-AmpiA-puroA-GAPDH	917	AseI	859	GSC 2778
pGLEX-AmpiB-puroB-GAPDH	869	AseI	1049	GSC 2779
pGLEX41-[REP]	2119	BspHI	868	GSC 2239
pGLEX41-R6K-AmpiA-[REP]	865	BspHI	779	GSC 2240
pGLEX41-R6K-AmpiB-[REP]	1751	BspHI	806	GSC 2249
pGLEX-R6K-AmpiA-neoA	890	BspHI	764	GSC 2214
pGLEX-R6K-AmpiB-neoB	767	BspHI	654	GSC 2244
pGLEX-R6K-AmpiA-puroA	708	BspHI	659	GSC 2220
pGLEX-R6K-AmpiB-puroB	574	BspHI	746	GSC 2213

Пример 2. Трансфекция клеток экспрессионными векторами.

1. Материалы и методы.

Клетки CHO-S и клетки HEK293.

Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для экспрессии белков, так как они

имеют способность к правильной укладке, сборке и посттранскрипционной модификации рекомбинантных белков. Использовали линию клеток CHO, так как они хорошо описаны и не выступают в качестве хозяина для большинства патогенных вирусов человека, что делает их относительно безопасным хозяином для стабильной продукции терапевтических белков. Клетки яичника китайского хомяка (CHO-S, Invitrogen, Carlsbad, CA, США) культивировали в суспензии в среде PowerCHO-2 CD (Lonza, Verviers, Бельгия) с добавлением 4 мМ L-глутамин (Applichem, Германия) и инкубировали в качающемся инкубаторе (200 об/мин с круговым ходом 2,5 см) при 37°C, 5% CO₂ и влажностью 80%. Использовали клетки HEK293, так как их легко трансфицировать, и они позволяют быстро продуцировать рекомбинантные белки вплоть до низких граммовых количеств. Используемые клетки представляют собой клетки HEK293-EBNA (ATCC, Manassas, VA), и их культивируют по стандартной методике в суспензии в среде Ex-cell 293 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI).

Субкультивирование клеток CHO-S и HEK293 EBNA по стандартной методике проводили каждые 3-4 дня, используя плотность посева $0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, в свежую среду. Клетки культивировали, используя 10 мл среды в 50 мл пробирках для биореактора (Tubespin Bioreactor 50; TPP, Trasadingen, Швейцария), содержащих проницаемый фильтр, делающий возможным газообмен. Жизнеспособность клеток и концентрацию определяли с помощью автоматического цитометра Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), используя метод исключения клетками трипанового синего. Концентрацию клеток подтверждали методом на основе определения объема осажденных клеток (PCV) с использованием пробирок PCV (TPP, Trasadingen, Швейцария) для клеток CHO-S.

Объем осажденных клеток (PCV).

Метод PCV основан на центрифугировании определенного объема культуральной жидкости в мини-PCV пробирке (PCV Пробирка для определения объема осажденных клеток; TPP, Trasadingen, Швейцария) в течение 1 мин при 5000 об/мин. Во время центрифугирования клетки осаждаются центрифугированием в градуированном капилляре в основании пробирки. Процентное содержание объема осажденных клеток затем определяют путем оценки объема осадка по отношению к количеству центрифугированной жидкой клеточной культуры. Например, 1% PCV показывал, что 10 мкл клеточного осадка находилось в 1 мл культурной жидкости.

Для стандартного подсчета клеток 200 мкл каждого образца переносили с помощью пипетки в PCV-пробирку, и объем соответствующего осадка (в мкл) измеряли с помощью линейки (измеряющее устройство "с легким считыванием"; TPP, Trasadingen, Швейцария). Данный объем умножали на 5 для получения значения для 1 мл, и затем его умножали, используя специфичный по отношению к клетке коэффициент корреляции с получением оценки концентрации жизнеспособных клеток (в миллионах клеток/мл).

"Автоматизированный" подсчет клеток.

Концентрацию и жизнеспособность клеток определяли с помощью автоматизированного цитометра Countess® (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) при смешивании образца с таким же количеством трипанового синего. Затем раствор переносили пипеткой в слайд-камеру Countess" перед считыванием данных с помощью инструмента. Данный инструмент делает возможным автоматическое представление данных камеры с сеткой Нейбауэра, которая, после калибровки, определяет жизнеспособность клеток и концентрацию мертвых и живых клеток.

Анализ проточная цитометрия.

Проточная цитометрия представляет собой метод для анализа многих параметров индивидуальных клеток. Данный метод делает возможным количественный и качественный анализ клеток, которые фенотипически отличаются друг от друга, например мертвых клеток от жизнеспособных клеток (согласно размеру и грануляции клеток). Он также позволяет количественно оценивать клетки, которые экспрессируют белок интереса, такой как GFP. Клетки отбирали из культуры путем отмеривания пипеткой в стерильных условиях 300 мкл образцов и анализировали с помощью проточного цитометра Calibur с сортировкой клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, США), оснащенного аргонным лазером с воздушным охлаждением, излучающим при 488 нм. Анализы проводили с использованием программного обеспечения CellQuest. Эмиссию GFP детектировали с помощью FL-1, используя 530/30-нм-полосовой фильтр.

В первом канале обломки клеток, а также мертвые клетки исключали из анализа на точечной диаграмме SSC/FSC на линейной шкале. Затем флуоресценцию GFP живых клеток показывали на гистограмме на логарифмической шкале. Медианное значение распределения флуоресценции использовали для оценки уровня экспрессии GFP анализируемых популяций клеток.

Способ количественного определения IgG: Octet QK.

Система Octet QK (FortéBio, Menlo Park, CA, США) выполняет количественное определение антител, белков, пептидов, ДНК и других биологических молекул без мечения и обеспечивает кинетическую характеристику биомолекулярных связывающих взаимодействий. Корреляция между степенью связывания (нм) и концентрацией аккумулированного IgG1 (мкг/мл) образца позволяет количественно определять титр IgG с помощью калибровочной кривой.

Образцы клеток центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. Затем супернатант разбавляли (1/5 в

случае антитела IgG1) OctetBuffer в 96-луночной планшете перед анализом с помощью Octet, используя биосенсоры на основе Белка А (Белок А DIP и биосенсор READ, Forte Bio, США) с получением концентрации антитела на лунку.

Временная трансфекция с использованием JetPEI.

Временную и стабильную трансфекцию клеток CHO-S и HEK293 EBNA проводили, используя полиэтиленимин (PEI; JetPEI, Полиплюс-трансфекция, Illkirch, Франция). PEI представляет собой катионный полимер, который может образовывать комплексы с отрицательно заряженными молекулами, такими как ДНК. Положительно заряженный комплекс ДНК-PEI связывается с отрицательно заряженной поверхностью клеток, и поглощается путем эндоцитоза. Он достигает лизосомного компартмента, откуда он высвобождается путем лизиса в ядро. Высокая эффективность трансфекции комплексами ДНК-PEI обусловлена способностью PEI защищать ДНК от лизосомальной деградации. Клетки трансфицировали согласно руководству, предложенному производителем.

Все плазмиды линейаризовали перед стабильной трансфекцией (100 мкг ДНК ресуспендированные в 100 мкл Трис-ЭДТА, pH 7,5). Для временной трансфекции кольцевые плазмиды непосредственно использовали из ДНК, полученной при мидипрепаративном выделении. В данном исследовании временные трансфекции проводили в пробирках для биореактора 50 мл и не добавляли антибиотиков.

Стабильные клоны CHO-S, экспрессирующие IgG1 и GFP, получали в результате совместного трансфицирования одного экспрессионного вектора и двух векторов устойчивости (кодирующих устойчивость к пурамицину или неомичину соответственно).

Отбор стабильных пулов и мини-пулов.

Эффективность трансфекции определяли через 24 ч после трансфекции с помощью проточной цитометрии (цитометр BD FACS, #1293), анализируя внутриклеточную экспрессию GFP. Если процентное содержание GFP-позитивных клеток составляло больше чем 20%, трансфицированные клетки разводили селективной средой и распределяли в 96-луночные планшеты (для серийного разведения с образованием выделенных стабильных мини-пулов) или в Т-колбы (T-Flask) (с образованием стабильных пулов). Используемая селективная среда представляла собой PowerCHO-2, 4 mM глутамин, с добавлением разных концентраций генетицина и пурамицина.

Через семь дней после трансфекции строгость условий отбора возобновляли путем добавления к клеткам селективной среды. Как только колонии в 96-луночных планшетах сливались, с планшетов считывали данные с использованием флуоресцентного ридера.

Пулы в Т-колбах увеличивали до масштаба tubespin с использованием не содержащей антибиотики PowerCHO-2, 4 mM L-глутамин. Их жизнеспособность и концентрацию оценивали с помощью автоматизированного цитометра Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Как только плотность клеток этого позволяла, для каждого пула запускали посевную серию путем посева клеток при плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в 10 мл среды в пробирках 50 мл для биореактора (инкубировали на шейкере (200 об/мин) при 5% CO₂, 37°C и влажности 80%). Каждую посевную серию пересевали два раза в неделю путем посева клеток при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде для выращивания (концентрацию клеток определяли анализом PCV). Посевную серию использовали для инокулята всего серийного производства (партий).

В течение следующих 4-5 недель партии производства пересевали один раз в неделю в двукратной повторности. Стабильность пула оценивали с помощью FACS и экспрессии IgG, как описано выше для популяций клонов.

Запуски производства (периодическая ферментация).

Партии клеточных пулов сеяли в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, используя посевную серию для инокуляции, и клетки затем культивировали в течение 7 суток в среде Feed. В сутки 4 и 8 200 мкл клеток центрифугировали в течение 5 мин при 300 g и супернатант анализировали на предмет аккумулированного IgG с использованием Octet. Помимо этого, экспрессию GFP каждой партии анализировали с помощью FACS.

2. Результаты.

2.1. Временная экспрессия в клетках CHO.

Векторы, сравниваемые в данном исследовании, отличаются главным образом по их каркасу. Полная экспрессионная кассета (промотор, первый интрон, экспрессионная конструкция, поли(A)) являлась точно такой же для всех векторов. Векторы получали из вектора pGLEX41, описанного в примере 1. В одном векторе ген устойчивости к ампициллину являлся оптимизированным по кодону для экспрессии в E.coli, и бактериальный каркас уменьшали до минимума: pGLEX41-R6K-Amp^rA-[REP] (коротко А). Во втором векторе ген устойчивости к ампициллину являлся оптимизированным по кодону для экспрессии в E.coli, а все последовательности CpG были устранены с использованием альтернативных кодонов (по возможности): данный вектор называется pGLEX41-R6K-Amp^rB-[REP] (коротко В). Третья модификация включала применение GAPDH-фланкирующих последовательностей, которые клонировали выше и ниже экспрессионной кассеты векторов А и В с образованием векторов pGLEX41-R6K-Amp^rA-[REP]-GAPDH (коротко GAPDHA) и pGLEX41-R6K-Amp^rB-[REP]-GAPDH (коротко GAPDHB).

Временные трансфекции клеток CHO-S (Invitrogen) осуществляли для сравнения уровня экспрессии

репортерных белков, экспрессируемых в условиях разных каркасов плазмиды. Трансфекции (в двух повторностях) проводили в 50 мл пробирках для биореактора (TPP, Trasadingen, Швейцария), используя 10 мл конечного объема среды, и анализировали в сутки 5 после трансфекции с помощью Octet (фиг. 2).

Все векторы (А и В) с правильным каркасом демонстрируют немного более высокий уровень экспрессии, чем контрольные векторы рGLEX41. Существует только незначительное различие между векторами А и В. Это ожидаемо, так как единственное различие в каркасе представляет собой устойчивость к ампициллину, которая не должна оказывать воздействие на временную экспрессию.

Наиболее неожиданным наблюдением является положительный эффект последовательностей GAPDH на экспрессию. Получают в два раза более высокий уровень экспрессии в случае плазмиды, несущей GAPDH-фланкирующие последовательности, по сравнению с плазмидами без последовательностей GAPDH. Это справедливо как для А, так и В конструкций. По сравнению с вектором рGLEX41, можно наблюдать в три раза более высокий уровень экспрессии. Это является даже более неожиданным, если учитывать размер плазмид. Вектор А (7048 п.н.) почти в два раза меньше по размеру, по сравнению с вектором GAPDH-А (13436 п.н.). Соответственно, при допущении, что количество доставленной ДНК во время процесса временной трансфекции является одинаковым для всех плазмид, только половина молярного количества GAPDH-А доставляется в ядро.

2.2. Временная экспрессия в клетках HEK293.

Временные трансфекции клеток EBNA HEK293 осуществляли для сравнения уровня экспрессии репортерных белков, экспрессируемых в условиях разных каркасов плазмиды. Трансфекции (в двух повторностях) проводили в 50 мл пробирках для биореактора (TPP, Trasadingen, Швейцария), используя 10 мл конечного объема среды, и анализировали в сутки 10 после трансфекции с помощью Octet (фиг. 3).

Результаты, показанные на фиг. 3, демонстрируют значительное увеличение в экспрессии, которое можно получать, используя GAPDH-фланкирующие области в клетках EBNA HEK293. Вектор GAPDH-В демонстрирует трехкратное увеличение в экспрессии, тогда как вектор GAPDH-А демонстрирует даже большее увеличение экспрессии, являющееся 5-кратным. Данные векторы не содержат элемента *oriP* и поэтому могли бы обладать потенциалом для даже более высоких титров.

2.3. Экспрессия в стабильных клеточных линиях CHO.

Получение стабильных трансфицированных клеток.

Стабильные популяции получали путем совместной трансфекции экспрессионного вектора и векторов, кодирующих гены устойчивости с последующим наложением давления отбора, опосредованного антибиотиками. Давление отбора снимали через 14 дней после трансфекции. Данные стадии позволяли получать стабильные мини-пулы и стабильные пулы, которые культивировали с равными временными интервалами при серийном производстве для сравнения уровней экспрессии репортерных белков (анти-тело IgG1 и GFP) разных конструкций и стабильности экспрессии.

Исследование экспрессии репортерных белков при серийном производстве, осуществляемое с использованием клеточных пулов.

Пулы получали в результате стабильной трансфекции. Во время процесса отбора (первые 14 дней после трансфекции) пулы анализировали FACS. Со временем могли наблюдать увеличение фракции GFP-позитивных клеток вместе с жизнеспособностью культуры. Давление отбора, опосредованное антибиотиками, снимали с пулов после 14 дней. Используя данный подход, можно было не получить клеточных пулов, трансфицированных плазмидами "В". Уровень экспрессии полученных пулов анализировали, как только клетки можно было культивировать в 50 мл пробирках для биореактора. Партии получали в двукратной повторности. Клетки анализировали FACS на предмет экспрессии GFP и аккумуляцию IgG в супернатанте анализировали Octet после 8 дней экспрессии.

Между титрами IgG и экспрессией GFP пулов можно было наблюдать пропорциональную зависимость. Вследствие этого, на фиг. 4 показаны только данные по IgG. Все пулы, трансфицированные векторами, содержащими последовательность GAPDH, демонстрируют более высокий уровень экспрессии, по сравнению с вектором рGLEX41 или с таким же вектором без последовательности GAPDH (фактор 2,8 при сравнении А и А-GAPDH. Никакого вывода после сравнения В и В-GAPDH сделать было нельзя, так как пул В не выжил).

Трансфекции, проведенные А-GAPDH and В-GADPH, вызывали более высокий уровень экспрессии IgG (в 2,7 и 3,5 раза больше соответственно), чем трансфекция рGLEX41 (для партии-2). Соответственно в пулах GAPDH-фланкирующие последовательности, по-видимому, являются благоприятными для получения белков. Наконец, трансфекции, проведенные векторами В-GADPH, включали более высокий уровень экспрессии IgG, чем трансфекция, проведенная А-GAPDH (фактор 1,25). Соответственно снижение *CrG* в генах устойчивости, по-видимому, также является благоприятным для стабильного получения белков.

Исследование уровня экспрессии на клональных популяциях.

Клетки трансфицировали и распределяли в 96-луночных планшетах в селективной среде для получения клональных или олигоклональных популяций. После 7 дней давление отбора обновляли добавлением к клеткам селективной среды. Экспрессию GFP оценивали через 14 дней после трансфекции путем использования ELISA-планшет-ридера (твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты показаны

на фиг. 5.

Подтверждая результаты, полученные в клеточных пулах, клетки, трансфицированные векторами, содержащими GAPDH-фланкирующие последовательности, экспрессировали значительно больше GFP, чем такой же каркас без последовательностей, расположенных выше и ниже GAPDH (факторы в 1,7-2 раза), или другие векторы, используемые в качестве контроля (pGLEX41: в 2,5 раза) (фиг. 5). Помимо этого, популяции с векторами, содержащими последовательности устойчивости, у которых было снижено содержание CrG (B), индуцировали более высокий уровень экспрессии, чем соответствующие векторы, которые только имели оптимизированный кодон (A) (в 1,5 раза при сравнении A и B; 1,2 раза при сравнении B и B-GAPDH).

На основе исследования экспрессии можно было сделать несколько выводов. Во-первых, последовательность, расположенная ниже и выше GAPDH, делает возможной более высокую экспрессию, чем стандартный вектор, который использовали в качестве критерия сравнения (pGLEX41). Также получают более низкий уровень экспрессии, когда клетки трансфицируют таким же каркасом вектора без последовательностей GAPDH, подтверждая то, что благоприятный эффект на экспрессию связан с вставленными GAPDH-фланкирующими последовательностями. Помимо этого, снижение числа CrG в экспрессионных и селективных плазмидах, по-видимому, является также в некоторой степени желательным для экспрессии.

Пример 3. Уровень временной экспрессии клеток CHO-S GMP, трансфицированных новыми сконструированными векторами.

В литературе описано, что 5'-область промотора GAPDH несет потенциальный инсулин-отвечающий элемент, а также форболовый эфир-отвечающий элемент (Alexander-Bridges et al., (1992), *Advan Enzyme Regul*, 32:149-159). Форболовый эфир-отвечающий элемент (-1040-1010 п.н.) находится выше того, что обычно называют промотором GAPDH (-488 - +20). В исследовании делеций, выполненном на стабильных клеточных линиях гепатомы H35, авторы не могли продемонстрировать значительно-го эффекта, оказываемого делецией пар оснований от -1200 до -488 (относительно точки начала транскрипции). Поэтому форболовый эфир-отвечающий элемент мог не быть функционально связанным с экспрессией, происходящей от промотора GAPDH. Тем не менее, для оценки вклада инсулина и PMA (форбол-12-миристан-13 ацетат, чаще всего форболовый эфир) в повышение уровня временной и стабильной экспрессии, которое наблюдали, используя плазмиды, содержащие GAPDH-фланкирующие элементы, проводили экспериментальное исследование временной трансфекции.

Для получения среды для роста, не содержащей инсулин, PowerCHO2 получали из среды-порошка, и не добавляли инсулин. PMA приобретали в Sigma (St. Louis, MO) и дозировали в конечной концентрации 1,6 мкМ (что соответствует концентрации, используемой Alexander-Bridges на клеточных линиях гепатомы H35) в PowerCHO2 (+/- инсулин).

Трансфекции проводили в 50 мл пробирках для биореактора (Tubespins, TPP, Trasadingen, Швейцария), как описано ранее. Для того чтобы избежать наличия инсулина, обусловленного OptiMEM (Life technologies, Carlsbad, CA), среду для трансфекции заменяли на RPMI1640 (PAA, Pasching, Австрия) с добавлением 4 mM Gln и 25 mM HEPES (N-2-гидроксэтилпиперазин-N'-2-этансульфонатная кислота). После трансфекции клетки распределяли в 12-луночных планшетах и добавляли 1 мл четырех разных сред (PowerCHO2, 4 mM Gln, +/- инсулин; PowerCHO2, 4 mM Gln, 1,6 мкМ PMA, +/- инсулин).

Снова использовали репортерную конструкцию, экспрессирующую IgG1 и GFP с использованием двух IRES (описано в примере 2). Данный вектор позволял осуществлять проверку эффективности трансфекции. Процентное содержание и жизнеспособность трансфицированных клеток обнаруживали сходными во всех четырех препаратах сред.

Как показано на фиг. 6, значительного эффекта освобождения от инсулина и/или добавления PMA не могли наблюдать во время данного эксперимента. Похожие титры получали во всех средах, используемых для экспрессии. Это дает основания полагать, что потенциальные форболовый эфир- и инсулин-отвечающие элементы, находящиеся во фланкирующей последовательности, расположенной выше гена GAPDH, не оказывают действия на временную экспрессию трансгена.

Пример 4. Анализ фрагментации ДНК, фланкирующей экспрессионную кассету GAPDH выше промотора и ниже сайта поли(А), для изучения эффекта, оказываемого на экспрессию репортерного гена.

Локус GAPDH человека локализован на хромосоме 12 генома человека. Описано, что GAPDH является конститутивно активным во всех клетках, происходящих из млекопитающего, так как фермент является ключевым игроком в метаболизме глюкозы. Выше промотора ген GAPDH фланкирован NCAPD2, геном, который распространяется более чем на 30000 п.н. Ниже сайта полиаденилирования ген GAPDH фланкирован IFF01 (см. фиг. 7 для получения более подробной информации).

Не только GAPDH и промотор, но также и фланкирующие области являются очень консервативными среди разных видов (см. табл. 4).

Таблица 4: Фрагменты с высокой гомологией среди GAPDH-фланкирующих областей человека, крысы и мыши. Анализ проводили с использованием Clone manager 9 (SciED, Cary, NC, США). Нумерацию ведут относительно первого основания фланкирующего элемента, расположенного выше или в нисходящем направлении (SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно). Последовательности, используе-

мые для выравнивания, представляли собой 532-3731 оснований (в восходящем направлении) и 8164-11364 оснований (в нисходящем направлении) SEQ ID NO: 18 для мыши и 719-3918 оснований (в восходящем направлении) и 8495-11058 оснований (в нисходящем направлении) SEQ ID NO: 19 для крысы.

Область, в восходящем направлении				Область, в нисходящем направлении			
Гомологичные последовательности [крыса]		Гомологичные последовательности [мышь]		Гомологичные последовательности [крыса]		Гомологичные последовательности [мышь]	
>80 %	>90 %	>80 %	>90 %	>80 %	>90 %	>80 %	>90 %
161-249	279-331	15-69	278-329	1608-1764	1706-1764	1614-1671	1904-2061
256-338	554-623	159-249	546-626	1894-2067	1912-2061	1888-2072	2927-3071
515-659		273-342				2918-3082	
2296-2349		515-647					
2381-2513		1143-1223					
2736-2818		1957-2009					
		2029-2080					
		2375-2485					
		2730-2821					

Сравнение гомологии ДНК у грызуна и человека демонстрирует минимум консервативности ДНК, составляющий 38%. Наличие консервативного фрагмента ДНК за пределами промоторной области или области, кодирующей ген, показывает, что для поддержания последовательности ДНК или для допущения только определенных/незначительных изменений на клетку могло бы быть наложено давление отбора. В данном конкретном случае GAPDH-фланкирующие области могли бы быть важны для клеток, так как они поддерживают высокий уровень экспрессии генов GAPDH. Можно было бы вести отбор, направленный против изменений в последовательности ДНК, приводящих к снижению уровня экспрессии.

Для оценки вклада элемента, расположенного выше или ниже GAPDH, в наблюдаемое увеличение уровня экспрессии, создавали конструкции, содержащие только последовательность, фланкирующую GAPDH в восходящем направлении (SEQ ID NO: 7), фрагменты области, фланкирующей GAPDH в восходящем направлении или область, фланкирующую GAPDH в нисходящем направлении (SEQ ID NO: 8). Репортерное антитело типа IgG1 экспрессировали с помощью конструкции IRES (легкая цепь-IRES-тяжелая цепь), избегая, вследствие этого, совместной трансфекции множества плазмид. Подробности, касающиеся фрагментации фрагмента, расположенного выше GAPDH, показаны на фиг. 8. Использовали следующие фрагменты области, фланкирующей GAPDH в восходящем направлении: Фрагмент 1 (SEQ ID NO: 9), фрагмент 2 (SEQ ID NO: 10), фрагмент 3 (SEQ ID NO: 11), фрагмент 4 (SEQ ID NO: 12), фрагмент 8 (SEQ ID NO: 13), фрагмент 9 (SEQ ID NO: 14), фрагмент 11 (SEQ ID NO: 15), фрагмент 17 (SEQ ID NO: 16).

Используемая GAPDH-фланкирующая область, расположенная в восходящем направлении (SEQ ID NO: 7), действительно содержит 2×3 (всего шесть) нуклеотидов сайта рестрикции NruI, из которых три связаны с геномной ДНК на своем 5'-конце, и три связаны с геномной ДНК на своем 3'-конце. Используемая GAPDH-фланкирующая область, расположенная в нисходящем направлении (SEQ ID NO: 8), действительно содержит 2×3 (всего шесть) нуклеотидов сайта рестрикции ScaI, из которых три связаны с геномной ДНК на своем 5'-конце, и три связаны с геномной ДНК на своем 3'-конце. Фланкирующая область, расположенная выше GAPDH, и фланкирующая область, расположенная ниже GAPDH, без нуклеотидов соответствующего сайта рестрикции показаны в SEQ ID NO: 20 (фланкирующая область, расположенная выше GAPDH, без сайтов рестрикции) и SEQ ID NO: 21 (фланкирующая область, расположенная ниже GAPDH, без сайтов рестрикции). Каждый из используемых фрагментов фланкирующей области, расположенной выше GAPDH, действительно содержит три нуклеотида соот-

ветствующего сайта рестрикции на своем 5'-конце и/или своем 3'-конце, связанном с геномной ДНК (фрагмент 1 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 5'-конце; фрагмент 2 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 3'-конце; фрагмент 3 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 5'-конце; Фрагмент 4 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 3'-конце; Фрагмент 8 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 3'-конце; Фрагмент 9 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 5'-конце и три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 3'-конце; Фрагмент 11 содержит три нуклеотида сайта рестрикции NruI на своем 3'-конце). Фрагмент 17 не содержит нуклеотидов сайта рестрикции. Фрагменты фланкирующей области, расположенной выше GAPDH, без нуклеотидов соответствующего сайта рестрикции показаны в SEQ ID NO: 22 (фрагмент 1 без сайта рестрикции), SEQ ID NO: 23 (фрагмент 2 без сайта рестрикции) SEQ ID NO: 24 (фрагмент 3 без сайта рестрикции), SEQ ID NO: 25 (фрагмент 4 без сайта рестрикции), SEQ ID NO: 26 (фрагмент 8 без сайта рестрикции), SEQ ID NO: 27 (фрагмент 9 без сайта рестрикции), SEQ ID NO: 28 (фрагмент 11 без сайта рестрикции).

Эффект элементов, расположенных выше и ниже GAPDH, на экспрессию оценивали в сутки 10 после трансфекции, используя Octet (Fortebio, Menlo, CA, США) для количественного определения IgG1, выделенного в супернатант (см. фиг. 9). pGLEX41, исходный вектор, дает результаты с более низким уровнем экспрессии (80%), по сравнению с улучшенной новой конструкцией вектора, используемой в каркасах pGLEX41-amp^rA. По сравнению с исходным каркасом pGLEX41, новая конструкция включает оптимизацию кодона гена amp^rA, необходимую для устойчивости к ампициллину в *E. coli*, другую точку начала репликации (R6K вместо точки начала репликации pUC) и устранение ненужных линкерных (или спейсерных) последовательностей бактериального происхождения. Оба вектора имеют приблизительно один и тот же размер.

Неожиданно, pGLEX41-amp^rA, включающий элемент, расположенный выше (SEQ ID NO: 7) и ниже (SEQ ID NO: 8) по течению, (называемый pGLEX41-up/down на фиг. 9, показывающей результаты по экспрессии), дает более высокий уровень экспрессии (фактор 1,5), по сравнению с таким же вектором без последовательностей, расположенных выше и в нисходящем направлении. Если рассматривать разницу в размере (восходящий/нисходящий фрагменты увеличивают размер плазмиды приблизительно на 6000 п.н.) и, вследствие этого, различия в копиях плазмиды, доставляемых во время трансфекции, эффект мог бы быть даже более важным в расчете на плазмиду.

Вектор, содержащий только фрагмент (up), расположенный в восходящем направлении, демонстрирует уровень экспрессии, сходный с экспрессией исходной конструкции pGLEX41-amp^rA. Вектор, содержащий только фрагмент (down), расположенный в нисходящем направлении, демонстрирует значительное повышение (фактор 1,2) экспрессии, по сравнению с экспрессией исходно конструкции pGLEX41-amp^rA. Дополнительное повышение уровня экспрессии можно наблюдать, в случае, когда присутствует как фрагмент, расположенный в восходящем направлении, так и фрагмент, расположенный в нисходящем направлении. Фрагмент 9 и ближайший к промотору фрагмент 8 не показывают какого-либо различия в экспрессии, по сравнению с pGLEX41-amp^rA. Фрагмент 1, 11 и 17 демонстрируют повышение уровня экспрессии. Самый высокий уровень экспрессии наблюдали в случае фрагмента 4. Следует отметить, что ближайший к промотору фрагмент 8 не показывает какого-либо эффекта. Поэтому повышение уровня экспрессии не может объясняться ранее опубликованными последовательностями (Alexander-Bridges et al. (1992), Advan Enzyme Regul, 32:149-159), Graven et al. (1999), Biochimica et Biophysics Acta, 147:203-218).

Неожиданно фрагменты 2 и 3 приводят к значительному снижению уровня экспрессии. Это является неожиданным, особенно в виду того, что данные фрагменты, клонированные в обратном направлении (антисмысловые (AS) на фиг. 9), не вызывают данного эффекта. Для фрагментов 1, 8, 9, 11 и 17 не наблюдали различия в экспрессии для фрагментов, которые были включены в смысловой или антисмысловой ориентации (данные не показаны). Фрагмент 11, хотя и является частью фрагмента 2, не показывает данного эффекта. Соответственно, элемент последовательности, который, по-видимому, является неблагоприятным для экспрессии, должен по меньшей мере частично находиться на фрагменте BstBI-BstBI, который был удален во фрагменте 2 для получения фрагмента 11.

Помимо этого, предположение о том, что негативный элемент расположен (по меньшей мере частично) на фрагменте BstBI-BstBI, подтверждается повышением уровня экспрессии, наблюдаемым при сравнении фрагмента 3 (который включает фрагмент BstBI-BstBI) и фрагмента 1.

В то время как, по-видимому, нетрудно локализовать фрагмент, имеющий негативный эффект (BstBI-BstBI), из данного исследования менее очевидным является то, как данный негативный эффект, наблюдаемый в случае фрагмента 2 и 3, компенсируется элементами последовательности, находящимися в полном фрагменте, расположенном в восходящем направлении. Не исключено, что данный негативный эффект уравновешивается небольшим позитивным эффектом, который наблюдали во фрагменте 1 и фрагменте 4 (но повышение в уровне экспрессии в случае фрагмента 1 меньше, чем в случае фрагмента 4). Тем не менее, наблюдаемый позитивный эффект в случае фрагмента 4 (фактор 1,25), по-видимому, является менее важным, по сравнению с негативным эффектом (фактор 0,4). Кроме того, фрагмент 9, который представляет собой полную область, расположенную в восходящем направлении, без фрагмента

BstBI-BstBI, не показывает повышенной экспрессии, по сравнению с полной фланкирующей областью, расположенной выше GAPDH (тем не менее, фрагмент 9 включает фрагмент EcoRV-BstBI, который является частью фрагмента 2 и 3, и мог бы иметь негативный эффект на экспрессию).

Можно только делать предположения о механизме, лежащем в основе наблюдаемых эффектов. Зависимость от ориентации негативного эффекта, оказываемого на экспрессию, наблюдаемого в случае фрагментов 2 и 3, включает экспрессию неидентифицированных открытых рамок считывания (например, экспрессию нкРНК), так как не существует близлежащих промоторов, которые могли бы стимулировать экспрессию только одной ориентации. Тот факт, что экспрессия снижается ниже основного уровня, показывает не только на отсутствие позитивного эффекта (например, активность энхансера), но скорее наличие зависимого от ориентации негативного эффекта.

В заключение, неожиданное повышение уровня временной экспрессии в клетках CHO наблюдается в том случае, когда в экспрессионной плазмиде присутствуют обе фланкирующие области, области, расположенные в восходящем и в нисходящем направлении. Несмотря на то, что фрагмент 4, по-видимому, оказывает значительный позитивный эффект на экспрессию, не могли идентифицировать один фрагмент, который является ответственным за полное увеличение экспрессии, которое наблюдалось. Увеличение экспрессии экспрессионного вектора pGLEX41-amp^riA (up/down), по-видимому, является суммарным эффектом как фланкирующей области, расположенной в восходящем направлении, так и фланкирующей области, расположенной в нисходящем направлении.

Пример 5. Клонирование нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше гена GAPDH китайского хомяка и промотора китайского хомяка.

1.1. Клонирование в экспрессионный вектор нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше гена GAPDH китайского хомяка

Нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, амплифицировали из геномной ДНК клеток CHO-S (Life Technologies) с помощью ПНР. Геномную ДНК выделяли, как описано в примере 1.

Конструкции получали, используя промотор CMV мыши или промотор GAPDH китайского хомяка для экспрессии конструкции с репортерным геном [REP], описанной в примере 1.

Для клонирования последовательности геномной ДНК, расположенной выше гена GAPDH китайского хомяка, в комбинации с промотором CMV мыши, использовали праймеры GlnPr1896 и GlnPr1897 для амплификации фрагмента 3 т.п.н. ((п.н.) 672-3671 SEQ ID NO: 29) с использованием протокола ПЦР, описанного в примере 1, и с получением ампликона с SEQ ID NO: 30. Ампликон содержит последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, и 5'- и 3'-рестрикционные сайты, которые вводили с помощью праймеров.

Для клонирования последовательности геномной ДНК, расположенной выше гена GAPDH китайского хомяка, в комбинации с промотором GAPDH китайского хомяка, использовали праймеры GlnPr1902 и GlnPr1905 для амплификации фрагмента 3508 п.н., содержащего последовательность геномной ДНК, включающую последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, и промотор GAPDH ((п.н.) 672-4179 SEQ ID NO: 29) с получением ампликона с SEQ ID NO: 31. Во второй ПНР использовали GlnPr1901 и GlnPr1902 для амплификации фрагмента 508 п.н., содержащего только промоторную область ((п.н.) 3672-4179 SEQ ID NO: 29), с получением SEQ ID NO: 32. Интрон, используемый в векторе "А" (описан в примере 1), амплифицировали, используя праймеры GlnPr1903 и GlnPr1904.

Первую фьюжн ПЦР проводили с праймерами GlnPr1904 и GlnPr1901, используя ампликон с SEQ ID NO: 32 и ампликон с последовательностью интрона в качестве матриц. Ампликон содержит промотор GAPDH китайского хомяка, интрон и 5'- и 3'-сайты рестрикции, которые вводили с праймерами. Все праймеры показаны в таблице 5.

Вторую фьюжн ПЦР проводили с праймерами GlnPr1905 и GlnPr1904, используя ампликон с SEQ ID NO: 31 и ампликон с последовательностью интрона в качестве матриц. Ампликон содержит последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, промотор GAPDH китайского хомяка, интрон и 5'- и 3'-сайты рестрикции, которые вводили с праймерами.

После очистки на 1%-ном агарозном геле интересные полосы вырезали и чистили, используя набор "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" (Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария). Очищенные фрагменты клонировали в плазмиду pCR_Blunt, используя набор для клонирования Zero Blunt PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Продуктами лигирования трансформировали компетентные клетки E.coli TOP10 (Компетентные клетки E.coli TOP 10 One Shot; Invitrogen, Carlsbad, CA, США) и анализировали путем рестрикционного анализа образцов мини-преп. Это приводило к получению следующих плазмид:

pCR_Blunt[CHO-upstreamGAPDH], содержащая последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка,

pCR_Blunt[CHO-upstreamGAPDHGAPDHpromoter], содержащая последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, и промотор GAPDH и интрон из вектора "А", и

pCR_Blunt[CHO-GAPDHpromoter], содержащая промотор GAPDH и интрон из вектора "А".

Для оценки ампликонов на предмет их эффекта на экспрессию выделенного гена использовали вектор "А" (описан в примере 1). Как описано ранее, экспрессионная кассета, используемая в данном векторе, содержит полицистронный ген, кодирующий выделенные IgG1 и GFP (см. пример 1). Вследствие этого, трансфицированные клетки будут выделять моноклональное антитело IgG1 и аккумулировать внутриклеточный GFP зависимым образом.

Для высвобождения фрагмента-вставки 3 т.п.н., содержащего последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, конструировали плазмиду pCR_Blunt[CHO-upstreamGAPDH] с использованием рестриктазы NaeI. Данную вставку клонировали в каркас "А", расщепляли с использованием рестриктазы NruI и обрабатывали CIP (CIP; NEB, Ipswich, MA, США). Каркас и вставку лигировали вместе, используя T4 ДНК-лигазу (T4 ДНК-лигаза, NEB, Ipswich, MA, США), и затем ими трансформировали компетентные клетки E.coli PIR1. Клоны отбирали для получения мини-преп и последующего рестрикционного анализа. Полученную плазмиду называли "A_GAPDH_UP", подтверждали секвенированием и получали в масштабе мидипреп, используя набор NucleoBond Xtra Midi (Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария).

Для клонирования экспрессионных конструкций с использованием промотора GAPDH китайского хомяка, фрагменты-вставки высвобождали из плазмид pCR_Blunt[CHO-upstreamGAPDH_GAPDH promoter] и pCR_Blunt[CHO-GAPDHpromoter] путем расщепления с использованием рестриктаз NheI и NruI. Полученные фрагменты клонировали в каркас вектора "А", раскрывали, используя те же ферменты, и обрабатывали CIP. После лигирования T4 ДНК-лигазой и трансформации компетентных клеток E.coli PIR1 клоны отбирали для рестрикционного анализа образцов мини-преп. Полученные плазмиды называли "A_GAPDH_UP_Prom" (плазмида с нетранслируемой последовательностью геномной ДНК, расположенной выше GAPDH китайского хомяка и промотора) и "A_PR" (плазмида только с промотором), подтверждали секвенированием и получали в масштабе мидипреп, используя набор NucleoBond Xtra Midi (Macherey Nagel, Oensingen, Швейцария).

2. Оценка эффекта нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше гена GAPDH китайского хомяка, оказываемого на экспрессию конструкции с репортерным геном.

Клетки CHO-S трансфицировали в биореакторах TubeSpin, используя 10 мл объема среды (как описано в примере 2). Трансфицированные клетки инкубировали в качающемся инкубаторе при перемешивании 200 об/мин при 37°C, 5% CO₂ и влажности 80%. Супернатанты клеток анализировали на предмет экспрессии IgG1, используя систему Octet QK с биосенсорами на основе Белка А (FortéBio, Menlo Park, CA, США). Результаты показаны на фиг. 10.

Уровень экспрессии плазмиды, содержащей промотор GAPDH ("APR"), по сравнению с промотором CMV мыши (А), снижается на 50%, указывая на то, что промотор GAPDH китайского хомяка не является таким же сильным, как вирусный промотор. Плазмида, содержащая нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, в комбинации с промотором GAPDH китайского хомяка ("A_GAPDH_UP_Prom"), демонстрирует двухкратное повышение уровня транскрипции, по сравнению с конструкцией, имеющей только промотор GAPDH ("APR"). Плазмида, содержащая нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше гена GAPDH китайского хомяка, и промотор CMV мыши ("A_GAPDH_UP"), демонстрирует самый высокий уровень экспрессии и повышение более чем на 40%, по сравнению с плазмидой, содержащей только промотор CMV мыши (А). Это подтверждает тот факт, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше гена GAPDH китайского хомяка, обладает усиливающим эффектом на экспрессию репортерного белка.

Таблица 5: Праймеры, использованные для клонирования в примере 5.

Праймер	SEQ ID No	Последовательность	Ориентация	Рестрикт. сайт
GlnPr 1896	SEQ ID No 33	TACGGCCGGCTTCACTGTACAGTGGCACAT	прямая	NaeI
GlnPr 1897	SEQ ID No 34	TCAGGCCGGCCGTGGTTCTTCGGTAGTGAC	обратная	NaeI
GlnPr 1901	SEQ ID No 35	TACTCGCGAAGAAGATCCTCAACTTTTCCACAGCC	прямая	NruI
GlnPr 1902	SEQ ID No 36	GTTCACTAAACGAGCTCTGCTATTTATAGGAAC TGGGGTG	обратная	/
GlnPr 1903	SEQ ID No 37	CACCCAGTTCCTATAAATAGCAGAGCTCGTT TAGTGAAC	прямая	/
GlnPr 1904	SEQ ID No 38	CGCTAGCACCGGTCGATCGA	обратная	NheI
GlnPr 1905	SEQ ID No 39	TACTCGCGATTCACTGTACAGTGGCACATAC	прямая	NruI

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета, которая содержит промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и элемент, усиливающий экспрессию, причем элемент, усиливающий экспрессию, содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже промотора глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) млекопитающего, причем полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, причем положение нуклеотида определяется относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже промотора GAPDH млекопитающего, составляет от приблизительно 95 до приблизительно 15000 нуклеотидов.

2. Экспрессионная кассета по п.1, отличающаяся тем, что экспрессионная кассета дополнительно содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше промотора GAPDH млекопитающего, причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от около 5'-конца промотора GAPDH млекопитающего до положения нуклеотида около -3500, причем положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет от приблизительно 100 до приблизительно 15000 нуклеотидов.

3. Экспрессионная кассета, содержащая промотор, полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, и нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше

промотора GAPDH млекопитающего, причем полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от 5'-конца промотора GAPDH млекопитающего, до положения нуклеотида около -3500, причем положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет от 100 до приблизительно 15000 нуклеотидов, при условии, что экспрессионная кассета не содержит промотора GAPDH млекопитающего или его фрагментов.

4. Экспрессионная кассета по п.3, отличающаяся тем, что экспрессионная кассета дополнительно содержит нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже промотора GAPDH млекопитающего, причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, причем положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже промотора GAPDH млекопитающего, составляет от приблизительно 95 до приблизительно 15000 нуклеотидов.

5. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше промотора GAPDH млекопитающего, функционально не связана с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид.

6. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что экспрессионная кассета дополнительно содержит сайт полиаденилирования.

7. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже промотора GAPDH млекопитающего, составляет приблизительно 10 нуклеотидов и простирается при своей максимальной длине до предпоследнего интрона гена IFF01 или до его части.

8. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, начинается ниже сайта полиаденилирования GAPDH млекопитающего, и причем длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной ниже промотора GAPDH млекопитающего, составляет по меньшей мере приблизительно 95 нуклеотидов и при своей максимальной длине распространяется до предпоследнего интрона гена IFF01.

9. Экспрессионная кассета по п.2, отличающаяся тем, что длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов и при своей максимальной длине распространяется до старт-кодона гена NCAPD2.

10. Экспрессионная кассета по п.2, отличающаяся тем, что длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов и при своей максимальной длине распространяется до третьего с конца интрона гена NCAPD2.

11. Экспрессионная кассета по п.3, отличающаяся тем, что длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет по меньшей мере 100 нуклеотидов и при своей максимальной длине распространяется до старт-кодона гена NCAPD2.

12. Экспрессионная кассета по п.3, отличающаяся тем, что длина нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет по меньшей мере 100 нуклеотидов и при своей максимальной длине распространяется до третьего с конца интрона гена NCAPD2.

13. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже и/или выше промотора GAPDH млекопитающего, происходит из последовательности грызуна или человека.

14. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

15. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

16. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 21 или их фрагментов.

17. Экспрессионная кассета по п.2 или 3, отличающаяся тем, что нетранслируемая последователь-

ность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов.

18. Экспрессионная кассета по п.17, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов, содержит пять или менее модификаций нуклеиновой кислоты.

19. Экспрессионная кассета по п.2 или 3, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов.

20. Экспрессионная кассета по п.2 или 3, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28 или их фрагментов.

21. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что промотор и полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, функционально связаны.

22. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, ориентирована в таком же направлении, как полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид.

23. Экспрессионная кассета по п.1 или 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, ориентирована в обратном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

24. Экспрессионная кассета по п.2 или 3, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, ориентирована в таком же направлении, как полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид.

25. Экспрессионная кассета по п.2 или 3, отличающаяся тем, что нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, ориентирована в обратном направлении относительно полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид.

26. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что промотор выбран из группы, состоящей из промотора SV40, промотора MPSV, промоторов CMV мыши, tk человека, CMV человека, CMV крысы, EF1 альфа человека, EF1 альфа китайского хомяка, GAPDH человека, гибридных промоторов, включая промотор MYC, HYK и CX.

27. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что полипептид выбран из группы, состоящей из антител, фрагментов антител или производных антител.

28. Экспрессионная кассета по п.6, отличающаяся тем, что сайт полиаденилирования выбран из группы, состоящей из BGH-поли(A) и SV40-поли(A).

29. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая генетический элемент, выбранный из группы, состоящей из дополнительного промотора, энхансера, транскрипционных регуляторных элементов и селективируемого маркера.

30. Экспрессионная кассета по п.29, отличающаяся тем, что генетический элемент представляет собой селективируемый маркер, причем содержание сайтов CpG, содержащихся в полинуклеотидной последовательности, кодирующей селективируемый маркер, составляет 45 или менее.

31. Экспрессионный вектор, содержащий экспрессионную кассету по любому из пп.1-30.

32. Экспрессионный вектор, который содержит следующее в указанном порядке:

a) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше и/или ниже промотора GAPDH млекопитающего;

b) промотор;

c) полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид;

d) сайт полиаденилирования;

e) нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже и/или выше промотора GAPDH млекопитающего,

и при этом полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, не является GAPDH, и причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная ниже промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от положения нуклеотида около +1 до положения нуклеотида около +7000, причем положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина нетранслируемой последовательности ДНК, расположенной ниже промотора GAPDH млекопитающего, составляет от приблизительно 95 до приблизительно 15000 нуклеотидов, и причем нетранслируемая последовательность геномной ДНК, расположенная выше промотора GAPDH млекопитающего, начинается в пределах области, простирающейся от около 5'-конца промотора GAPDH млекопитающего до положения нуклеотида около -3500, причем положение нуклеотида определено относительно точки начала транскрипции мРНК GAPDH, и причем длина

нетранслируемой последовательности геномной ДНК, расположенной выше промотора GAPDH млекопитающего, составляет от приблизительно 100 до приблизительно 15000 нуклеотидов, при условии, что в том случае, если а) или б) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше GAPDH млекопитающего, е) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже GAPDH млекопитающего, и в том случае, если а) или б) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную ниже GAPDH млекопитающего, е) представляет собой нетранслируемую последовательность геномной ДНК, расположенную выше GAPDH млекопитающего.

33. Экспрессионный вектор по п.32, отличающийся тем, что энхансер присутствует между элементами д) и е), между а) и б) или перед элементом а).

34. Экспрессионный вектор по пп.31, 32 или 33, отличающийся тем, что экспрессионный вектор дополнительно содержит генетический элемент, выбранный из группы, состоящей из дополнительного промотора, энхансера, транскрипционных регуляторных элементов, точки начала репликации и селективируемого маркера.

35. Экспрессионный вектор по пп.31, 32 или 33, отличающийся тем, что экспрессионный вектор дополнительно содержит точку начала репликации и селективируемый маркер, причем содержание сайтов CpG, содержащихся в полинуклеотидной последовательности экспрессионного вектора, кодирующей точку начала репликации и селективируемый маркер, составляет 200 или менее.

36. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионную кассету по любому из пп.1-30 или экспрессионный вектор по любому из пп.31-35.

37. Применение экспрессионной кассеты по любому из пп.1-30 в качестве лекарственного средства для лечения расстройства.

38. Применение экспрессионной кассеты по любому из пп.1-30 в генной терапии.

39. Применение экспрессионного вектора по любому из пп.31-35 в качестве лекарственного средства для лечения расстройства.

40. Применение экспрессионного вектора по любому из пп.31-35 в генной терапии.

41. Способ *in vitro* экспрессии полипептида, включающий трансфекцию клетки-хозяина экспрессионной кассетой по любому из пп.1-30 или экспрессионным вектором по любому из пп.31-35 и выделение полипептида.

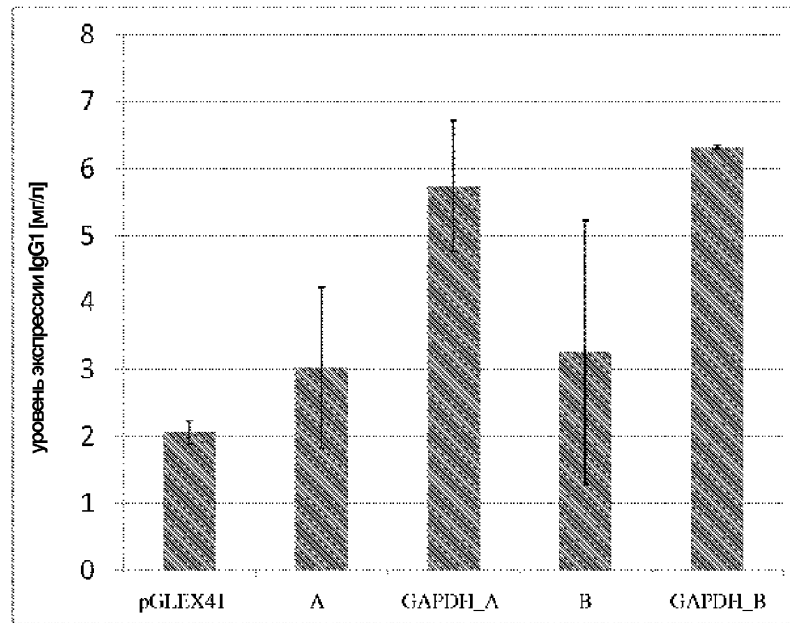
42. Способ по п.41, отличающийся тем, что проводят стабильную трансфекцию экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора.

43. Способ по п.41, отличающийся тем, что проводят временную трансфекцию экспрессионной кассеты или экспрессионного вектора.

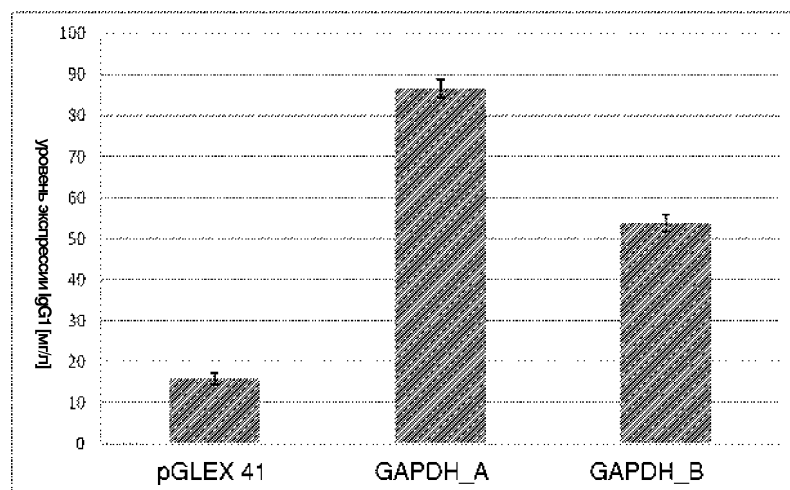
44. Применение экспрессионной кассеты по любому из пп.1-30 или экспрессионного вектора по любому из пп.31-35 для экспрессии гетерологичного полипептида из клетки-хозяина млекопитающего.



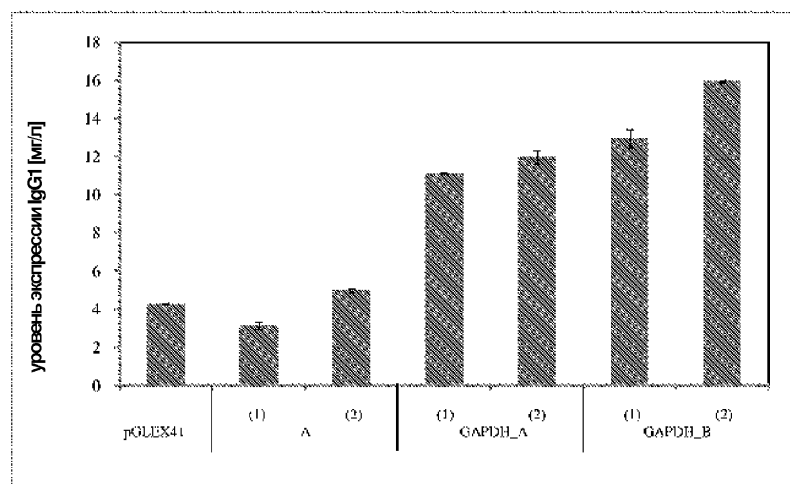
Фиг. 1



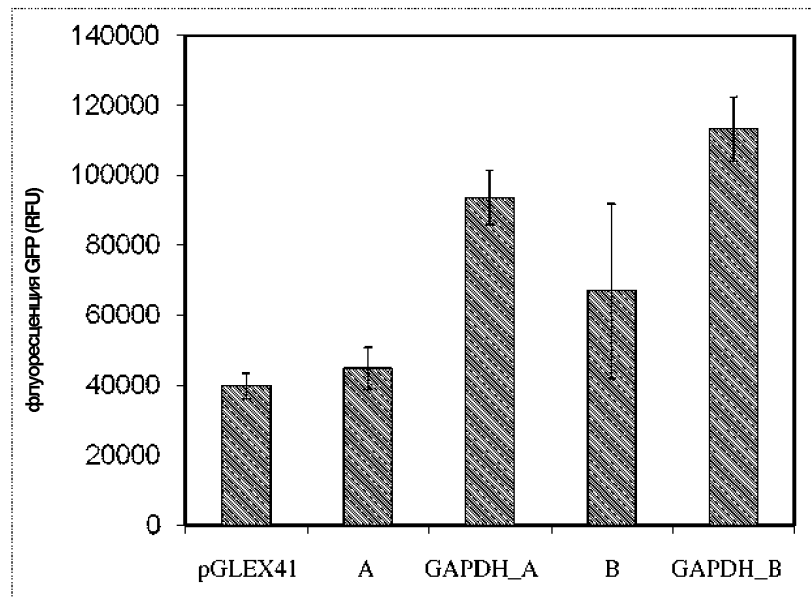
Фиг. 2



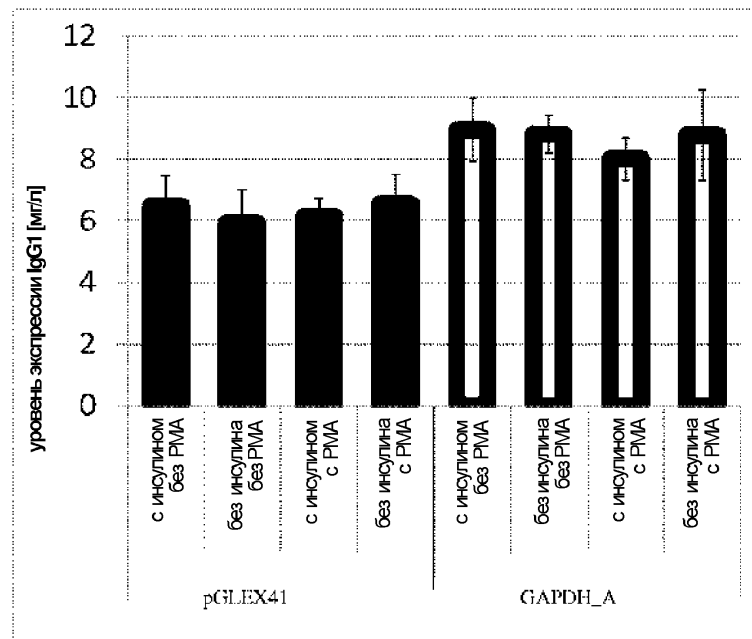
Фиг. 3



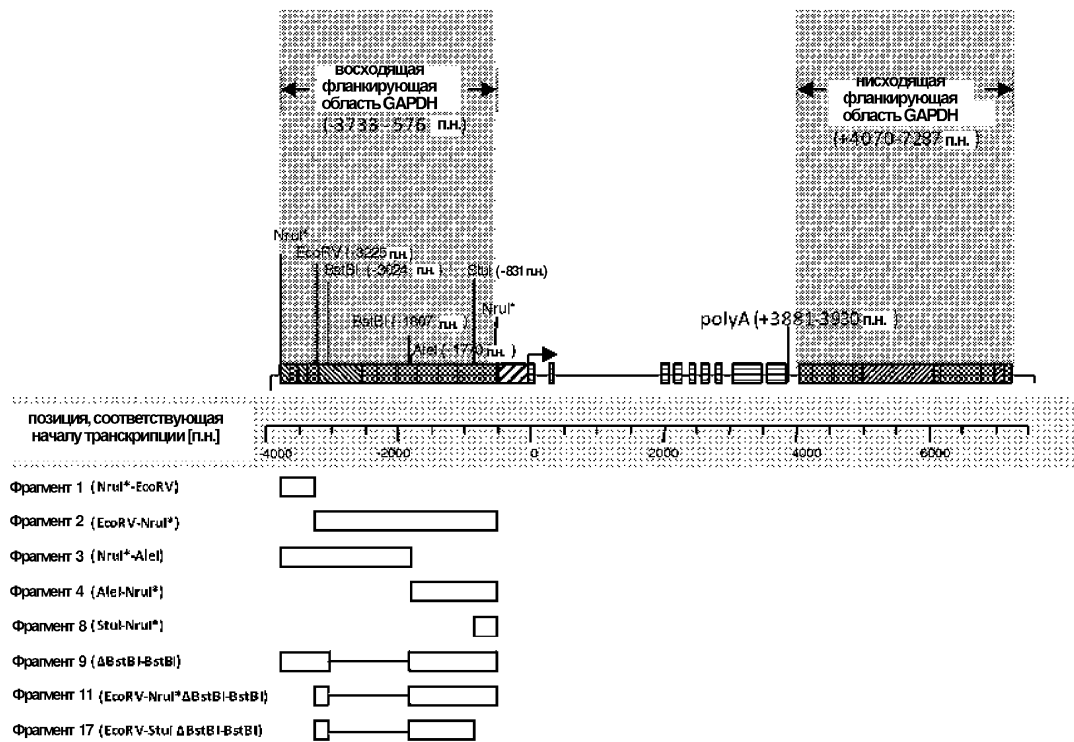
Фиг. 4

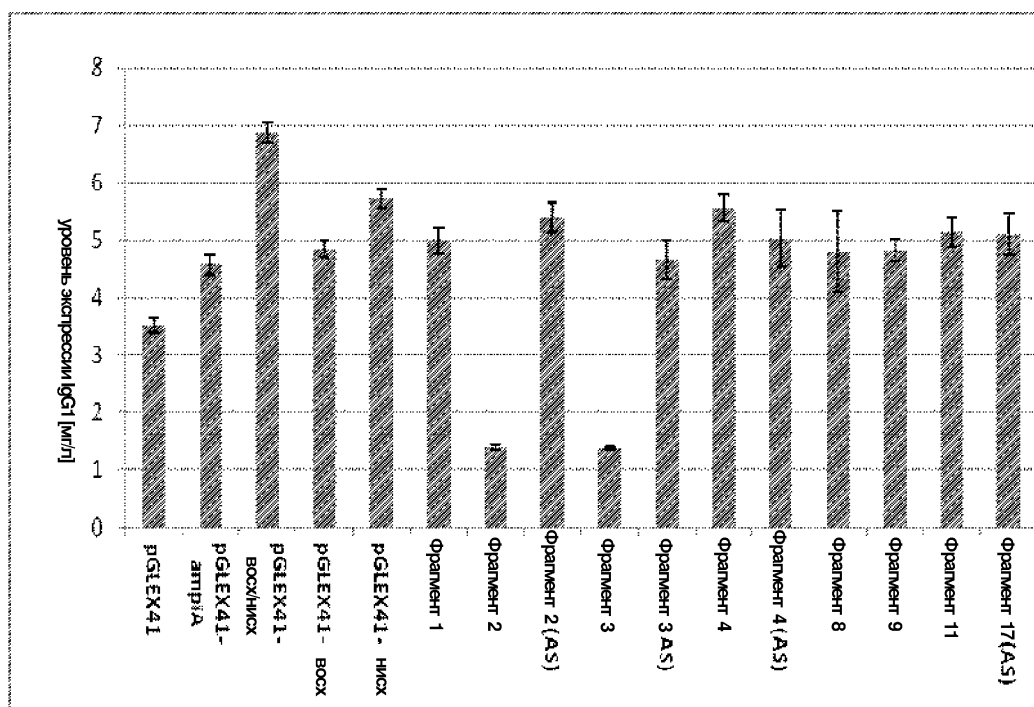


Фиг. 5

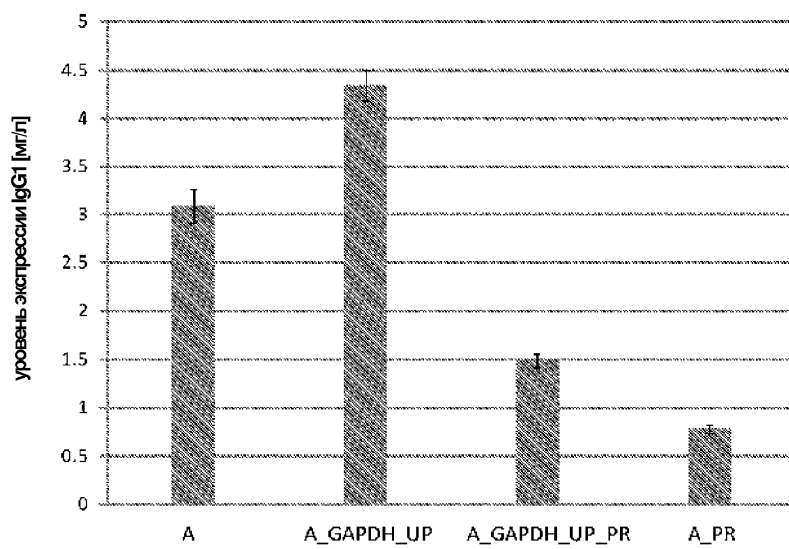


Фиг. 6





Фиг. 9



Фиг. 10

