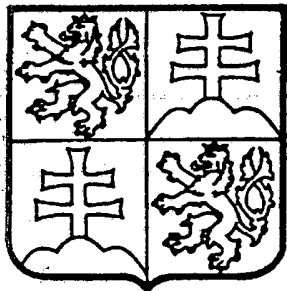


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA

(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 2671-92

(13) A3

(51) C 12 N 15/85
C 12 P 21/02
C 12 N 15/12
C 12 N 15/14
C 12 N 15/18
C 12 N 15/55

(22) 28.08.92

(32) 21.12.90, 19.12.91

(31) 90/27917, 91/GB9102274

(33) GB, WO

(40) 16.12.92

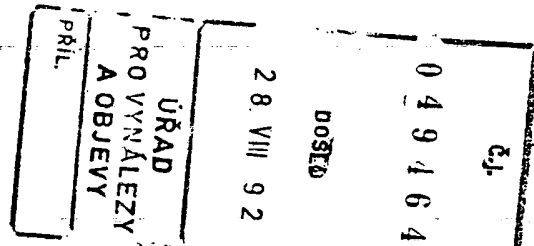
(71) IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, London, GB;

(72) Hollis Melvyn, Macclesfield, GB;
Needham Maurice Ronald Charles, Macclesfield, GB;
Gooding Clare, Macclesfield, GB;
Grosveld Franklin Gerardus, London, GB;
Antoniou Michael, London, GB;

(54) **Expresní systémy**

(57) Expresní systémy, které obsahují savčeho hostitele, jako jsou erythroidní buňky, transformované vektorem, který obsahuje promotor, DNA sekvenci, která koduje požadovaný polypeptid a dominantní kontrolní oblast. Dále jsou popsány vektory a metody pro přípravu polypeptidů za použití expresních systémů. V preferovaných realizacích, vektor obsahuje cDNA pro požadovaný polypeptid a sekvenci, která je schopná stabilizovat mRNA produkovanou z cDNA. Expresní systémy jsou obzvláště účinné a jsou schopné sekretovat požadovaný polypeptid.

EXPRESNÍ SYSTÉMY

Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k technice genového inženýrství a zejména k metodě přípravy polypeptidů v savčích hostitelích. Předkládaný vynález se také vztahuje k vektorům používaným v těchto metodách a k hostitelským buňkám vytvořeným těmito vektory.

Dosavadní stav techniky

Mnoho biologicky aktivních proteinů nebo polypeptidů je vytvářeno v eukaryotických buňkách, avšak ve svých původních buňkách nebo tkáních se nacházejí pouze v mizivých kvantech. Vyčistit tyto proteiny ve větším množství může být extrémně složité nebo nákladné, často vzhledem díky vzácnosti jejich přírodního výskytu. Metody genového inženýrství umožnily vytvořit sekvence komplementární DNA (cDNA), kodující požadované proteiny. Tyto cDNA mohou být vneseny insercí do klonovacích vektorů (spolu s vhodnými regulačními oblastmi nutnými pro expresi) a zavedeny do vhodných hostitelských buněk. Zavedení takovýchto vektorů do vhodných buněk umožňuje buňkám produkovat polypeptid zakodovaný v cDNA. Podobné vektory mohou být vytvořeny za pomoci genomových (tj. pomocí intronů a exonů) sekvencí, které vytvářejí požadovaný gen. Eukaryontní buňky (a zejména savčí buňky) jsou schopny provádět větší počet posttranslačních modifikací (jako např. amidaci, glykosylaci atd.), které nelze pozorovat při expresi v prokaryontních buňkách. Následkem toho savčí buňky často produkují proteiny které mnohem blíže připomínají přirozené, biologicky aktivní molekuly bílkovin. Velkoobjemová kultivace savčích buněk je však drahá a pomalá ve srovnání s kultivací prokaryontních buněk, a jsou neustále vymýšleny metody pro

zvýšení produktivity živočišné buňky a ke snížení časového intervalu potřebného k vytvoření užitečného množství bílkovinného produktu živočišnou buňkou.

Obecně, zavedení cizí DNA (jako jsou např. výše uvedené vektory) do živočišných buněk vede k náhodné integraci jedné nebo více kopií DNA do genomu buňky. Hladina exprese genů z cizorodého genu je velmi závislá na místě integrace cizí DNA do hostitelského genomu ("posiční efekt"). Integrace do takzvané "aktivní oblasti" obvykle poskytuje poněkud vyšší hladiny exprese, ale tyto jsou často stále nízké ve srovnání s úrovní jakou lze nalézt u nativního chromozomálního (bez transfekce) genu. Úrovně u transfekovaných genů nejsou obecně ve vztahu k počtu kopií ve kterékoliv buňce, což je další důsledek posičního efektu.

Běžnou technikou používanou ke zvýšení produktivity transfektovaných hostitelských buněk je *in vivo* amplifikace integrované cizí DNA, aby vznikly integranty o vysokém počtu kopií. Při těchto postupech gen, který je středem zájmu (spolu s příslušnými řídicími sekvencemi) je ko-transfektován spolu s genem, který může mít ochrannou funkci proti nějaké toxické látce. Běžně používaný ochranný gen je gen pro dihydrofolát reduktasu (DHFR). Při aplikaci zvyšující se koncentrace methotrexátu (MTX), kompetitivního inhibitoru esenciálního enzymu DHFR, na transfektované buňky, přežijí pouze buňky s vyšší hladinou exprese DHFR. S dále se zvyšující hladinou MTX přežijí pouze buňky, které amplifikují počet kopií genu DHFR (a následkem toho též ko-transfektovaný rekombinantní expresní konstrukt). Tímto způsobem počet kopií a tedy hladina exprese (tj. produktivita na buňku) cDNA může být zvýšena.

Nedávno byl popsán nový, zesilovači podobný, element z lokusu lidského globinu (Grosveld a kol., 1987: WO

89/01517), který řídí expresi heterologních genů v erythroidních buňkách, a to expresi s vysokou hladinou, polohově nezávislou, závislou na počtu kopií. Tento element je extrémně specifický k typu buněk, a funguje pouze v erythroidních buňkách. Tento element s dominantní řídicí oblastí (DCR) byl použit k překonání pozičního efektu při expresi lidského beta-globinu v erythroidních buňkách. Tento odkaz, WO 89/01517, popisuje použití tohoto zesilovacího elementu při expresi beta-globinu z globinového promotoru.

Použití DCR pro expresi heterologních proteinů však nenašlo široké uplatnění vzhledem k povaze erythroidních buněk a poznatku, že tyto buňky nejsou schopny dostatečné sekrece.

Existuje velká potřeba savčího expresního systému schopného exprese heterologních polypeptidů.

Existuje také potřeba zlepšených savčích expresních systémů schopných vysoké hladiny exprese polypeptidů.

Existuje také potřeba savčího expresního systému schopného exprese nějakého polypeptidu s vysokou hladinou exprese a schopného sekretovat exprimovaný polypeptid.

Podstata vynálezu

Bylo nyní objeveno, že savčí expresní systémy mohou být použity k expresi heterologních polypeptidů, a zejména že určité savčí expresní systémy, které zahrnují DCR jsou schopny exprese polypeptidů s vysokým výtěžkem. Byly také objeveny savčí expresní systémy schopné docílit vysoké hladiny exprese polypeptidu, a následně sekrece exprimovaného polypeptidu.

Předkládaný vynález proto poskytuje savčí expresní systém schopný exprese heterologních polypeptidů.

Podle toho předkládaný vynález poskytuje expresní systém sestávající ze savčího hostitele transformovaného vektorem, který sestává z promotoru, sekvence DNA kodující požadovaný polypeptid a z dominantní řídicí oblasti.

Sekvence DNA, která koduje požadovaný heterologní polypeptid bude, obecně, obsahovat gen, který je heterologním genem v tom smyslu, že se v hostiteli v přírodě nenachází.

Promotor může zahrnovat libovolný promotor schopný funkce v hostitelské buňce. Například promotor může zahrnovat promotor, který se vyskytuje v hostiteli v přírodě, nebo může zahrnovat heterologní promotor, tzn. promotorb, který se normálně v hostiteli v přírodě nenachází. Příklady prvního zahrnují například situaci, kdy je hostitelem erythroidní buňka a promotor může sestávat z promotoru beta-globinu. Příklady druhého zahrnují například situaci, kdy hostitelem je erythroidní buňka, a promotorem je promotor PLA2.

Příklady preferovaných savčích hostitelů zahrnují například erythroidní buňky jako jsou buňky myší erythroleukemie (MEL), krysí erythroleukemie (REL) a lidské erythroleukemie (HEL). Zejména vhodným hostitelem jsou buňky MEL, jejichž produkční schopnosti a charakteristika jsou popsány Deisserothem a kol., Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 72, No.3, p 1102-1106; Deisseroth a Hendrick, Cell, 15, 55-63, 1978; a Friend a kol., Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 68, No.1, p 378-382, 1971.

Expresní systémy, které jsou součástí předkládaného vynálezu byly shledány obzvláště výhodnými. Například

jsou-li hostitelem erythroidní buňky (zejména buňky MEL), pak expresní systém byl shledán překvapivě výhodným. Mezi výhody takovéhoho expresního systému patří například skutečnost, že hostitel může být kultivován relativně snadno bez potřeby speciálních požadavků jako je například vysoký obsah sera. Neočekávané bylo také zjištění, že systém funguje účinně i bez potřeby selektovat individuální klony schopné vysoké exprese. Proto byl expresní systém, který je předmětem předkládaného vynálezu shledán překvapivě účinným a flexibilním systémem.

Dále bylo objeveno, že jsou-li hostitelem erythroidní buňky, může se exprese vyskytovat s překvapivou účinností. Exprese může být intracelulární, uvnitř buněčné stěny, nebo může být doprovázena sekrecí. To bylo neočekávané. Zejména bylo neočekávané, že takovýto expresní systém mohl být použit pro sekreci.

Byly konstruovány též expresní systémy obsahující heterologní promotor, a bylo zjištěno, že tyto systémy jsou překvapivě účinné.

Dalším předmětem tohoto vynálezu jsou vektory použitelné pro vznik expresních systémů tohoto vynálezu.

Výhodný vektor obsahuje sekvenci, která je schopna stabilizovat mRNA odvozenou z DNA sekvence kodující požadovaný polypeptid. Bylo zjištěno, že takové vektory jsou zejména výhodné v tom, že zvyšují vysoké hladiny exprese

Tak v části tohoto vynálezu je popsán vektor, takový vektor obsahující promotor, dominantní řídicí oblast, DNA sekvenci kodující požadovaný polypeptid a DNA sekvenci, která je schopna propůjčit stabilitu mRNA odvozené od té DNA sekvence, která kóduje požadovaný polypeptid.

Je výhodné, jestliže DNA sekvence, která kóduje požadovaný polypeptid obsahuje cDNA.

Výraz "dominantní řídicí oblast" (nebo "DCR"), zde užívaný, představuje sekvenci DNA, která je schopna spojenému genovému expresnímu systému, pokud je tento integrován do genomu hostitele kompatibilního s dominantní řídicí oblastí, propůjčit schopnost exprese omezené na určitý buněčný typ hostitele, nezávislé na místě integrace a závislé na počtu kopií. Dominantní řídicí oblast si podržuje tuto vlastnost i když je plně rekonstituována uvnitř chromozomu hostitelské buňky, a schopnost řídit účinně expresi omezenou na určitý buněčný typ hostitele je zachována i když dojde k plné reformaci v heterologním pozadí jako je odlišná část homologního chromozomu nebo dokonce odlišný chromozom.

Výraz "vektor" jak je používán zde, je používán ve svém nejširším významu a zahrnuje ve svém významu jakýkoliv materiál rekombinantní DNA schopný přenášet DNA z jedné buňky do druhé. Vektor může zahrnovat jeden kus DNA v lineární nebo kruhové formě.

Předkládaný vynález poskytuje tedy vektor, který může být integrován do savčích hostitelských buněk. Předkládaný vynález také poskytuje transferový vektor jako je plasmid, což je užitečné například při konstrukci vektoru pro integraci.

Vektor může nádavkem k sekvencím DNA uvedeným výše, zahrnovat také jiné sekvence DNA vhodné pro speciální aplikace, jako jsou například vhodné řídicí sekvence. Například může vektor zahrnovat sekvence DNA umožňující replikaci vektoru také v bakteriálním hostiteli jako je například E. coli, a selekci na přítomnost tohoto vektoru v daném hostiteli. Vektor může zahrnovat "selektovatelný

marker", gen, který při expresi poskytuje nějakou bílkovinu v množství schopném chránit rekombinantní hostitelskou buňku proti toxické látce. Příklady selektovatelných markerů zahrnují neomycinové a hygromycinové markery. Obecně cDNA expresní vektory budou zahrnovat polyadenylační oblast kompatibilní s promotorem. Například polyadenylační oblasti může být tato oblast beta-globinového genu, v kterémžto případě může být doprovázena sekvencí ležící "po proudu" od adenylační oblasti beta-globinu, například asi 2kb sekvence směrem od polyadenylační oblasti.

Promotor může být tvořen libovolným promotorem schopným funkce v hostitelské buňce. Například promotor může být tvořen beta-globinovým promotorem nebo promotorem PLA2. V jedné součásti vynálezu je preferováno, aby promotor byl tvořen beta-globinovým promotorem, zejména pokud jsou hostitelskými buňkami buňky erythroidní. V další části předkládaného vynálezu je preferováno, aby promotor obsahoval promotor PLA2 a hostitelské buňky byly erythroidní buňky.

Sekvence DNA, která přenáší stabilitu na mRNA tvořenou ze sekvence DNA kodující požadovaný polypeptid, může být spojena se sekvencí DNA kodující požadovaný polypeptid takovým způsobem, že je vytvářena hybridní mRNA, která je mnohem stabilnější než mRNA ze sekvence DNA kodující požadovaný polypeptid. Sekvence mohou být spojeny přímo jedna s druhou nebo nepřímo (to znamená že na sebe mohou kontinuálně navazovat nebo mohou být odděleny další sekvencí DNA), za předpokladu že stabilita je přenášena na mRNA vytvářenou z DNA, která koduje pro produkci žádaného polypeptidu, vytvořením hybridní mRNA, která je mnohem stabilnější než mRNA kodující pro požadovaný polypeptid.

Sekvence schopná přenést stabilitu na mRNA může s výhodou také poskytovat vhodné místo ke štěpení, což umožňuje vytvářet správně sestřiženou RNA.

Sekvence schopná přenést stabilitu na mRNA může zahrnovat exon a intron ze savčího genu. Takový exon a/nebo intron může být přítomen jako celek nebo jen v části.

Zvláštním příkladem sekvence schopné přenést stabilitu na mRNA, je sekvence sestávající z beta-globinového genu, nebo sekvence z tohoto odvozená, která zahrnuje dva exony a jeden intron, jako je exon 2, intron 2 a exon 3. Jeden nebo každý exon a/nebo každý intron může mít redukovanou délku, a zejména exon 2 může mít redukovanou délku tak, že sekvence zahrnuje exon 2 nebo část exonu 2, intron 2 a exon 3.

Obecně je preferováno, aby sekvence zahrnovala 3 -konec beta-globinového genu, nebo jeho část. Například sekvence může zahrnovat sekvenci až po přirozené štěpící místo XbaI u base 4845 beta-globinového genu.

Beta-globinový gen byl již mnohokrát popsán (viz., například, Lawn a kol., Cell, 21, 647-651, 1980).

Sekvence cDNA koduje požadovaný polypeptid a může dát vznik například intracelulárnímu, povrchovému nebo sekretovanému polypeptidu. Příklady sekvence cDNA zahrnují cDNA lidského beta-globinu, cDNA lidského růstového hormonu, cDNA lidského PLA₂, a cDNA lidského G-CSF.

Je preferováno, aby promotorem byl heterologní promotor. Pokud je použit heterologní promotor, jako je třeba promotor PLA₂, je získaná hladina exprese překvapivě vysoká.

Dominantní řídicí oblast, neboli DCR, může zahrnovat sekvenci definovanou ve W089/01517 (Grosveldt a kol.) a která je zde zahrnuta jako citace (citovaná v tomto odkazu jako dominantní aktivátorová sekvence).

Dominantní řídicí oblast může být odvozena metodami genového inženýrství z genového systému, který se přirozeně vyskytuje v přírodě, anebo může odpovídat přirozeně se

vyskytujícímu genovému systému v tom smyslu, že je vytvořen pomocí známých technik syntesy polynukleotidů podle sekvenčních dat vztahujících se k přirozeně se vyskytujícímu genovému systému. Změny v této sekvenci mohou být učiněny, tyto však nemění funkci dominantní řídicí oblasti.

S výhodou tímto přirozeně se vyskytujícím genovým systémem, z něhož je dominantní řídicí oblast odvozena, a nebo jemuž tato odpovídá, je systém, který vykazuje expresní charakteristiku velice omezenou na určitý typ hostitelské buňky, nejlépe s vysokou hladinou exprese. Specifickými příklady takovýchto systémů jsou hemoglobinové systémy jako je beta-globinový systém a lymfocytární systémy jako je systém CD2.

Dominantní řídicí oblast může být tvořena, být odvozena, nebo odpovídat jedné nebo více super hypersensitivním oblastem DNasy I, zejména jakéhokoli genového systému schopného buněčně specifické exprese. Jiné sekvence mohou však také vykazovat funkční charakteristiky dominantní řídicí oblasti. Pokud přirozeně se vyskytující dominantní řídicí oblast zahrnuje dvě nebo více podsekvencí oddělených intervenující polynukleotidovou sekvencí nebo sekvencemi, dominantní řídicí oblast může obsahovat dvě nebo více subsekvencí spojených za nepřítomnosti jedné nebo několika intervenujících sekvencí. Takže, pokud dominantní řídicí oblast přirozeně se vyskytujícího genového lokusu zahrnuje dvě nebo více diskretních podsekvencí oddělených intervenujícími nefunkčními sekvencemi, (například dvěmi nebo více super hypersensitivními oblastmi) vektor, který je předmětem vynálezu může zahrnovat dominantní řídicí oblast sestávající ze dvou nebo více vzájemně spojených podsekvencí se všemi nebo s částí odstraněných intervenujících sekvencí.

DCR může být odvozena z lokusu beta-globinového

genu. Jak je diskutováno ve WO 89/01517, lokus beta-globinového genu obsahuje větší počet super hypersensitivních oblastí DNasy I, které vytváří DCR. S výhodou dominantní řídicí oblast obsahuje jednu nebo více super hypersensitivních oblastí DNasy I identifikovaných uvnitř beta-globinového lokusu. Pokud možno tyto od 5 konce lokusu, případně se sekvencemi 3 konce. Dominantní řídicí oblast se nachází uvnitř fragmentu o 21kb od -1kb ClaI to -22kb BglII ihned proti směru od epsilon-globinového genu v beta-globinovém lokusu. Tato oblast obsahuje čtyři super hypersensitivní oblasti DNasy I s intervenujícími polynukleotidy (pět oddělených oblastí z nichž dvě jsou velmi blízko u sebe). S výhodou mohou být některé nebo všechny intervenující nukleotidy odstraněny za použití známých technik jako je štěpení exonukleasou.

Byla vytvořena redukováná forma dominantní řídicí oblasti beta-globinového lokusu, která vykazuje výrazně zvýšenou hladinu exprese připojeného systému pro expresi genů. Toto bylo vytvořeno (viz. WO 89/01517) ligací následujících čtyř fragmentů.

- 2.1kb XbaI - XbaI
- 1.9kb HindIII - HindIII
- 1.5kb KpnI . BglII
- 1.1kb částečný fragment SacI

Tato dominantní řídicí oblast, známá jako "mikro lokus", je fragment o velikosti 6,5kb, který může být použit jako "kazeta" k aktivaci specifického genového expresního systému.

Dominantní řídicí oblast může být odvozena od lokusu genu CD2. Lokus genu CD2 obsahuje tři super hypersensitivní oblasti, jednu na 5 hranici lokusu a dvě u

3 konce lokusu. S výhodou obsahuje dominantní řídicí oblast jednu nebo více super hypersensitivních oblastí DNasy I uvnitř lokusu CD2. Ještě výhodněji dominantní řídicí oblast obsahuje obě super hypersensitivní oblasti od 3 konce lokusu, případně s odstraněnými všemi nebo částí intervenujících oblastí. Dominantní řídicí oblast je obsažena v rozmezí mezi 5,5kb BamHI a XbaI fragmentů u 3 konce genu CD2.

V jedné zejména zajímavé části se vektor uváděný v tomto vynálezu skládá z promotoru, dominantní řídicí oblasti, cDNA sekvence kódující požadovaný polypeptid a DNA sekvence, která je spojena se zmíněnou sekvencí cDNA tak, že hybridní mRNA je v hostiteli produkována v mnohem stabilnější formě než když k tomu dochází ze samotné cDNA.

Příklady různých sekvencí jsou uvedeny výše.

Jak bylo výše uvedeno DNA sekvence mohou být spojeny přímo nebo nepřímo.

Vynález též zahrnuje metodu přípravy polypeptidu, která zahrnuje způsob kultivace expresního systému uváděného v tomto vynálezu. Tak hostitel bude kultivován za příslušných podmínek, které jsou nezbytné pro růst hostitele.

Jak bylo výše uvedeno, mohou být expresní systémy nebo hostitelé (a tudíž vektory), uváděné v tomto vynálezu, použity k sekreci polypeptidů.

Vynález dále poskytuje vektor použitelný pro přípravu polypeptidu v savčím hostiteli, tak, že polypeptid je vylučován z hostitelských buněk, zmiňovaný vektor se skládá z promotoru, dominantní řídicí oblasti a genu, který kóduje požadovaný polypeptid, za předpokladu, že zmíněný gen není genem pro lidský beta-globin.

Promotor a dominantní řídicí oblast neboli DCR mohou mít kteroukoli výše uvedenou definici. Také výraz vektor a další volitelné sekvence jsou jak bylo definováno výše.

Vektor může být použit pro dosažení sekrece polypeptidu ze savčího hostitele.

Podle druhého aspektu tohoto vynálezu může gen zahrnovat jakoukoli sekvenci DNA schopnou exprese a tak vytvářet polypeptid, který je sekretován z hostitele.

Předkládaný vynález takto také poskytuje metodu přípravy polypeptidu, která zahrnuje kultivaci expresního systému, který je tvořen savčím hostitelem transformovaným pomocí vektoru jak je definováno ve druhém aspektu předkládaného vynálezu tak, aby byl produkován polypeptid sekretovaný ven z hostitele.

V dalším aspektu předkládaného vynálezu je poskytována metoda produkce polypeptidu v savčím hostiteli, například v erythroidních buňkách, podle níž je polypeptid sekretován z hostitelských buněk.

Obecně bude sekretovaný polypeptid "sklizen" pomocí standardních technik známých v oboru a může, bude-li třeba, být dále zpracováván nebo purifikován.

Hostitel může obsahovat vektor jak je definováno výše.

Hostitelem může být libovolný organismus dle definice uvedené výše. Obecně je preferováno, aby hostitel byl tvořen erythroidními buňkami, zejména buňkami erythroleukémie (například buňkami myši erythroleukémie).

Je též předkládán postup pro přípravu vektoru předmětu vynálezu (jak je definováno zde v předcházejícím).

Předkládaný vynález také poskytuje postup na přípravu vhodného hostitele dle předkládaného vynálezu, kterýžto postup zahrnuje transformaci a transfekci savčího hostitele pomocí vektoru dle předmětu vynálezu.

Vektor může být transfektován do populace hostitelských buněk libovolně z většího počtu vybranou transfekční metodou, která poskytne integraci alespoň jedné kopie (ale výhodněji více kopií) expresního vektoru do genomu hostitele (ve funkční formě). Po transfekci jsou buňky kultivovány po dobu umožňující integraci DNA expresního vektoru a expresi genu selektovatelného markeru. Populace buněk je dále vystavena účinku dostatečně vysoké koncentrace toxické látky proti níž chrání selektovatelný marker tak, aby došlo ke zničení buněk, které nemají stabilně integrovanou DNA expresního vektoru. Závěrem jsou klony buněk, které exprimují vysoké hladiny RNA genu produktu, nebo vysoké hladiny produktu samotného selektovány některou z libovolně dostupných metod, které jsou odborníkům dobře známy.

Jak je uvedeno výše, savčí hostitelskou buňkou může být libovolná savčí hostitelská buňka schopná přijmout vektor podle předkládaného vynálezu. Tak může hostitelská buňka být buňkou lidskou nebo živočišnou, a zejména se může jednat o buňku transgenního živočicha, jako je například myš. Proto předkládaný vynález též poskytuje popis pro transgenního živočicha, který byl transfektován vektorem podle předkládaného vynálezu (jak je definováno v prvním nebo druhém aspektu předkládaného vynálezu).

Expresní systémy (nebo transformovaní hostitelé) podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro produkci

požadovaného polypeptidu in vitro nebo in vivo. Předkládný vynález dle tohoto také poskytuje metodu genové terapie, která zahrnuje odstranění kmenových buněk z těla živočicha, zničení kmenových buněk, zbylých v těle, transformaci odstraněných buněk pomocí vektoru, který je předmětem vynálezu (jak je definováno v prvním nebo druhém aspektu předkládaného vynálezu), který obsahuje sekvenci DNA kódující polypeptid, potřebný pro živočicha, a umístění transformovaných kmenových buněk v živočišném těle.

Tak tato metoda genové terapie může být použita k nahrazení nebo doplnění odlišného genu v nějakém živočichovi.

Vhodným zdrojem kmenových buněk je kostní dřeň, stojí za zmínku, že tato obsahuje jak lymfocyty, tak erythroidní kmenové buňky. Lze kladně hodnotit, že hostitelské buňky, podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat více než jednu kopii vektoru, který je předmětem vynálezu, tzn. vektoru podle prvního nebo druhého aspektu předkládaného vynálezu. Hostitelské buňky obsahující mnohočetné kopie DNA expresního vektoru mohou vznikat po dvou nebo více následných opakováních procesů transfekce a selekce (za použití odlišných selektovatelných markerů pro jednotlivá opakování) a nebo podrobením populace buněk, získaných výše uvedeným způsobem, běžnému amplifikačnímu postupu za účelem zvýšení počtu kopií DNA integrovaného expresního vektoru.

Expresní systém/vektory dle předkládaného vynálezu mohou být použity k přípravě heterologních polypeptidů a zejména polypeptidů, které mají užitečné farmakologické vlastnosti. Příklady takových polypeptidů zahrnují například GCSF, hGH a PLA2.

Předkládaný vynález poskytuje řadu výhod oproti

dřívějším způsobům a obecně odstraňuje mnoho problémů, které s těmito metodami souvisí.

Obecně, předkládaný vynález popisuje expresní systémy/vektory, které mohou být produkovány relativně vysokou rychlostí, a které poskytují vysoké hladiny exprese požadované RNA a polypeptidu. Obecně též předkládaný vynález poskytuje popis nových rekombinantních hostitelských buněk schopných vysokých hladin exprese požadovaného polypeptidu. Obecně jsou metody uváděné v předkládaném vynálezu použitelné pro jakoukoli eukaryotickou hostitelskou buňku, pro níž je popsána DCR sekvence nebo v níž je DCR sekvence aktivní nebo může být uzpůsobena tak, aby byla aktivní.

DCR elementy byly používány zejména v kombinaci s různými typy erythroidních buněk (buňky myšší erythroleukémie [MEL], krysí erythroleukémie [REL] nebo lidské erythroleukémie [HEL]) a bylo zjištěno, že tyto buňky sekretují heterologní proteiny s překvapující účinností. Byly vytvořeny nové expresní systémy, které jsou schopny vylučovat po dlouhou dobu vysoké hladiny heterologních bílkovin. tyto expresní systémy mohou být použity pro kultivaci v malém i velkém měřítku a sekreci in vitro, a tytéž vektory mohou být použity pro in vivo produkci bílkovin, buď produkci rekombinantní bílkoviny nebo jako součást postupu při genové terapii. Tento systém může účinně dodávat bílkoviny (s terapeutickou hodnotou) do krevního oběhu savců, nositelů vektoru.

Popis obrázků

Obr.1: Plasmidové mapy plasmidů pbetaH2, pbeta-mini a pGSE1417.

Obr. 2.: Konstrukce plasmidu pUNIVEC.

Obr.3: Plasmidová mapa pUNIVEC(pEC₂).

Obr.4: Konstrukce HGH cDNA.

Obrázek 4a ilustruje sekvenci oligonukleotidu použitého k obnově 5 konce HGH cDNA,

Obrázek 4b ilustruje inzerci oligonukleotidu do 5 konce HGH cDNA.

Obr.5: Konstrukce konečného expresního vektoru HGH cDNA.

Obr.6: Analýza indukovaných klonů MELC88 transfektovaných expresním vektorem HGH cDNA pomocí metody Northern blot. V tomto obrázku (i) označuje lidský růstový hormon HGH, a (ii) označuje myšší beta-globin. Řada A = klon 4, Řada B = PP1 (nahromaděná populace 1), Řada C = PP2 (nahromaděná populace 2), Řada D = klon 1, Řada E = klon 2, Řada F = klon 3, Řada G = MELC88 neindukovaný, Řada H = MELC88 indukovaný.

Obr.7: Konstrukce genomového expresního vektoru HGH.

Obr.8: Analýza indukovaných linií MELC88 transfektovaných genomovým expresním vektorem HGH pomocí metody Northern blot. V tomto obrázku (i) označuje lidský růstový hormon HGH, a (ii) označuje myšší beta-globin. Řada A = AP1, řada B = AP2, řada C = klon 5, řada D = klon 1, řada E = klon 3, řada F = klon 2, řada G = klon 4.

Obr.9: Změny 5 konce expresního vektoru HGH cDNA.

Obr.10: Dlouhodobá sekrece dvou HGH cDNA klonů buňkami MELC88.

Obr.11: Klonování PLA₂ cDNA.

Obr.12: Klonování genu PLA₂ do expresního vektoru.

Obr.13: Northern blot exprese PLA2 z genomových sekvencí PLA2. V tomto obrázku NI = neindukováno, I = indukováno, MEL = MelC88, 50C-1 = PLA2 cDNA klon, PP1, PP2 = nahromaděné klony PLA2 transfektovaných MelC88 buněk a 1,2,3,4 = individuální klony PLA2 transfektovaných MelC88 buněk. Obrázek 13 (a) = s probou PLA2, (b) = s probou-myším beta globinem, a (c) = s probou GAPDH.

Obr.14: Northern blot exprese PLA2 z "beta-globinového promotoru/PLA2 kódujícího" konstruktů. V tomto obrázku I = indukovaný, NI = neindukovaný, Mel = MelC88, PP = nahromaděná populace, 1,2,3,4,5,6,7 a 8 jsou individuální klony, 50C-1 = PLA2 cDNA klon.

Obr.15: Northern blot analýza exprese hlavní základní bílkoviny. V tomto obrázku (i) představuje hlavní základní bílkovinu, (ii) představuje globin, PP = nahromaděné populace, a a,b,a,c,e a f = jednotlivé klony

Obr.16: Zobrazuje výsledky stanovení usmrcení E.coli.

Obr.17: Northern blot analýza exprese TNFalfa receptoru. V tomto obrázku (i) představuje TNFalfa receptor, (ii) představuje myší globin, U = neindukovaný, I = indukovaný, a 1,2,3,4 a 5 jsou individuální klony.

Obr.18: Ilustruje expresi receptoru TNFalfa.

Obr.19: Northern blot analýza hNK-2 receptorových transfektovaných Mel buněk s probou fragmentu exonu 2 myšího beta globinu. V tomto obrázku + = indukováno v přítomnosti nějakého antagonisty hNK-2R.

Obr. 20: Northern blot analýza hNK-2 receptorových transfektovaných Mel buněk s probou hNK-2R cDNA. V tomto

obrázku + = indukováno v přítomnosti nějakého antagonisty hNK-2R.

Obr.21: Northern blot analýza exprese lidského sérového albuminu. V tomto obrázku (i) značí lidský sérový albumin, (ii) značí globin, I=indukovaný, NI = neindukovaný, a 1,2,3,4,5 a 6 jsou jednotlivé klony.

Obr.22: Northern blot analýza exprese hGH. V tomto obrázku (a) značí hGH RNA, (b) značí myší globin, U = neindukovaný, I = indukovaný, 1b,1c,1d,2a,2c,2f jsou jednotlivé klony.

Obr.23: Srovnání hGH/EC2 a hGH/EC3 v buňkách Mel. V tomto obrázku PP = nahromaděné populace, U = neindukovaný, I = indukovaný, 1,2,3,4,5 a 6 jsou jednotlivé klony.

Podrobný popis

A) Konstrukce vektorových DNA

Výsledné expresní vektory byly příhodně konstruovány ze dvou intermediálních plasmidů. Jeden plasmid (pGSE1417) obsahuje sekvenci DCR a gen selektovatelného markeru a druhý plasmid (odvozený z pUNIVEC) obsahuje expresní kazetu dle výběru. Plasmidy byly připraveny dle popsáným způsobem:

Konstrukce plasmidu pGSE1417

Tento plasmid (viz obr.1C), který obsahuje mikrolokus DCR beta globinu je přesně shodný jak uvádí Talbot a kol., Nature 338, 1989, viz také Collis a kol., EMBO Journal vol. 9, No 1, 233-240, 1990.

Konstrukce plasmidu pUNIVEC (zde též označován jako pEC₂)

Počínaje plasmidem pbetaH2 (obsahujícím lidský beta-globinový promotor od -800 do +30 a první exon myšního genu H2K, v kostře pBLUESCRIPT*; viz. obrázek 1A), oblast XhoI 5 až k beta-globinovému promotoru byla odstraněna za vzniku plasmidu pbetaH2-X. Beta-globinový promotor byl poté zkrácen na přibližně -400 prostřednictvím restričního štěpení pomocí PstI+BamHI za vzniku plasmidu p betaH2-X. Gen H2K byl potom odstraněn restričním štěpením pomocí HindIII+SstI a zaměněn syntetickým polylinkerovým oligonukleotidem jak uvedeno níže (SEQ ID. NO 1):-

```
5 AGC TTG AAT TCC CCG GGT CTA GAG CGG CCG CCT CGA GGG ATC
3 AC TTA AGG GGC CCA GAT CTC GCC GGC GGA GCT CCC TAG

CCT GCA GGT ACC ATC GAT GAG CT 3
GGA CGT CCA TGG TAG CTA C 5
```

kteřý obsahuje rekogniční sekvence pro HindIII, EcoRI, SmaI, XbaI, NotI, XhoI, BamHI, PstI, KpnI, ClaI a SstI restriční endonukleasy. Toto poskytlo plasmid p betaH2-X+Poly (také označováný jako pEC¹). K dokončení vektoru pUNIVEC (pEC₂) byl fragment genu lidského beta-globinu od přirozeného restričního místa BamHI v exonu 2 k oblasti PstI směrem "po proudu" (3) od tohoto, zahrnující exon 3 a polyadenylační oblast, oddělen od plasmidu pbeta-mini (obrázek 1B) a klonován do p betaH2-X+Poly mezi oblasti BamHI a PstI polylinkeru. Obrázek 2 naznačuje kroky zahrnuté v přípravě pUNIVEC.

8 pBLUESCRIPT je obecně dobře znám a dostupný. Například je dodáván firmou Stratagene.

Konstrukce expresních vektorů

V zásadě jsou veškeré cDNA expresní vektory konstruovány stejným způsobem. cDNA (například lidského růstového hormonu) byla klonována do polylinkeru pUNIVC s translační startovací oblastí nejbližší k beta-globinovému promotoru. expresní kazeta (beta-globinový promotor + cDNA + sekvence beta-globinového intronu/exonu a polyadenylační sekvence) byly potom přeneseny do vektoru pGSE1417 (obvykle jako fragment ClaI-KpnI do unikátních oblastí ClaI a KpnI v pGSE1417) tak, že beta-globinový promotor byl nejbližší k sekvenci DCR a expresní kazeta byla umístěna mezi sekvenci DCR a genem selektovatelného markeru (tk-nec). Obrázek 4 ukazuje konstrukci výsledného expresního vektoru pro cDNA lidského růstového hormonu (HGH).

Pro expresi heterologních proteinů z genomových sekvencí byly geny (včetně jejich přirozených polyadenylačních sekvencí) klonovány do prekursoru pUNIVC nazvaného p betaH2-X+Poly (pEC₁) (viz. obr. 2), který postrádá sekvence intron/exon lidského beta-globinu a beta-globinovou polyadenylační sekvenci.

B) Transfekce a selekce

Buněčné linie

V následujících příkladech byly použity buňky myší erythroleukemie (MEL). Produkce a charakteristiky buněk MEL jsou odborníkům známy a jsou popsány Deisserothem a kol., Proceedings of the national Academy of Sciences, Vol. 72, No. 3, str. 1102-1106, a Friend a kol., Proceedings of the national Academy of Sciences, Vol. 68, No. 1, str. 378-382, 1971). Následující příklady se vztahují na buněčné linie myší erythroleukemie MELC88 a 11A21, avšak přesná buněčná linie

není nejdůležitější a libovolná linie buněk myší erythroleukemie ve vhodné periodě své diferenciaci může být dle následujících příkladů použita. Globinové DCR jsou aktivní v erythroidních buňkách a buňky MELC88 a 11A21 byly indukovány aby se diferencovaly a staly se erythroidními za účelem zobrazení plné aktivity sekvence DCR.

Media

Veškeré zásobní buněčné linie byly pěstovány na neselektivních mediích, buď (A) Dulbeccovo minimální esenciální medium (DMEM, Flow laboratories, tekuté medium s uhličitanem sodným), doplněné 2mM glutaminu (Flow laboratories), 10% zárodečného telecího sera (1% pro 11A21) a antibiotika penicilin/streptomycin (Flow laboratories), nebo (B) alfa-MEM (Flow laboratories, tekuté medium) doplněné jak uvedeno výše. Transfektované buněčné linie byly udržovány na výše uvedených mediích s aminoglykosidem geneticin sulfátem (G418, Gibco-BRL Cat No 066-1811), přidaným do konečné koncentrace 1mg/ml, nebo s hygromycinem-B (Boehringer Mannheim) v konečné koncentraci 0,8mg/ml (nebo příležitostně s oběma antibiotiky). Linie transfektantů byly selektovány jak je uvedeno dále.

Linearizace expresních plasmidů

Za účelem zavedení expresních plasmidů do buněk byly tyto nejprve linearizovány štěpením restriktivním enzymem, který štěpí na jediném místě uvnitř plasmidu a který neinterferuje s transkripcí požadovaného genu nebo s genem selektovatelného markeru v savčích buňkách. Tímto enzymem byl pro většinu plasmidů PvuI, včetně pDCR/NEO/HGHcDNA a pDCR/NEO/HGHgenomové.

Elektroporace buněk

Buňky MEL byly sklizeny v exponenciální fázi růstu, dvakrát promyty pufrům pro elektrošoky (140mM NaCl, 25mM HEPES pH7,5, 0,75mM Na₂HPO₄) a potom resuspendovány na hustotu 10⁴ buněk/ml v čerstvém (ledovém) pufru pro elektrošoky. Jeden ml buněčné suspence (10⁷ buněk) bylo přidáno k linearizované plasmidové DNA (obvykle 10 -> 100ug DNA v diges4n9m pufru, vodě nebo 10mM Trisu, 1mM EDTA pH8,0) v elektroporační komůrce (kyveta Bio-Rad Gene Pulser, délka dráhy 0,4cm) a inkubováno na ledu po dobu 5-10 minut. Směs buněk a DNA byla potom podrobena pulsu při 250V za použití elektroporátoru Bio-Rad Gene Pulser při kapacitanci 960uF. Buňky byly ponechány v klidu po dobu 5-10 minut při pokojové teplotě a potom resuspendovány v neselektivním růstovém mediu a následně naneseny na 24-jamkové destičky pro tkáňové kultury při hustotách 10⁵ původních buněk na jamku (1 destička) a 10⁴ původních buněk na jamku (1 destička). Po uplynutí 20-30 hodin byl přidán do každé jamky shodný objem selektivního media (obvykle 1ml) s obsahem 2mg/ml G418 (nebo, pokud je vhodné, 1,6mg/ml hygromycinu-B). Výsledné buněčné suspence (v 1x selektivní mediu) byly inkubovány při 37°C v inkubátorech pro tkáňové kultury s 5-10% CO₂.

Elektroporované buněčné suspence byly inkubovány při 37°C po dobu 7-14 dní pokud nebylo možno pozorovat jednotlivé klony buněk resistantních proti antibiotiku. Tyto byly potom odebrány (pomocí pasteuřovy pipety nebo pomocí semiautomatické pipety Gilson Pipetman) jednotlivě nebo po nahromadění, a namnoženy v selektivním mediu.

Transfekce suspence buněk pomocí fosforečnanu vápenatého

Metoda dle Gorman a kol. (Molecular and Cellular Biology, 1044-1051, 1982) byla vždy používána a lze ji

stručně shrnout do následujících kroků: Roztok A byl připraven zředěním 20ul 70mM fosforečnanu sodného jedním ml 2x HBS pH7,1 (10g/l HEPES, 16g/l NaCl). Roztok B byl připraven zředěním 50ug DNA určené k transfekci v 1ml vody se 120ul 2M CaCl₂. Dvoumililitrová sraženina byla připravena přikapáváním roztoku B do roztoku A, který byl ponechán 20 minut při pokojové teplotě. Suspense buněk udržovaných v exponenciální fázi po dobu 2-3 dnů byla použita při hustotě 6-8 x 10⁵ buněk/ml. 2ml precipitátu bylo přidáno k 18 ml suspense buněk a inkubováno při 37°C po dobu 4-6 hodin. Buňky byly potom dvakrát promyty v PBS, spočítány a potom naneseny na 24-jamkové destičky pro tkáňové kultury při hustotách 2 x 10⁴/ml a 2 x 10⁵/ml. Destičky byly inkubovány přes noc při 37°C a poté bylo přidáno do každé jamky po 1ml roztoku 2mg/ml G418 v kultivačním mediu. Destičky byly poté ponechány při 37°C na 7-12 dní dokud se neobjevily kolonie.

Transfekce suspendovaných buněk lipofekcí

Suspense buněk byla udržována v logaritmické fázi růstu po dva až tři dny před transfekcí tak, aby v den transfekce byla přibližná hustota 5 x 10⁵/ml. transfekce byly prováděny za použití činidla DOTMA od firmy Boehringer Mannheim, podle postupu popsaného v návodu soupravy, který lze stručně shrnout do následujících kroků:

1. 100 ul disperze DOTMA (1mg/ml) bylo rozpuštěno ve 4 ml media pro tkáňové kultury.
2. 0,1 - 10 ug DNA bylo odděleně rozpuštěno ve 4 ml media pro tkáňové kultury. Roztoky DNA a DOTMA byly smíchány.
3. Medium bylo odstředěním odděleno od buněk a směs DOTMA/DNA byla přidána k buňkám, které byly poté inkubovány při 37°C po

dobu 3-6 hodin v přítomnosti 5-10% CO₂.

4. Směs DOTMA/DNA byla oddělena od buněk odstředěním, nahrazena normálním růstovým médiem a buňky byly nanесeny do 24 jamkových destiček, jak bylo výše popsáno. Selektivní medium bylo aplikováno dle výše uvedeného postupu.

INDUKCE EXPRESE

Indukce exprese byla provedena u klonů transfektovaných buněčných linií nebo nahromaděných populací shodným způsobem. Buňky byly udržovány v exponenciální fázi růstu každodenním naředěním na hustotu 2×10^5 buněk/ml. Po 3-4 denních naředěních byly buňky ponechány růst přes noc a poté byl k selektivnímu mediu přidán dimethylsulfoxid (DMSO) v konečné koncentraci 2%. Buňky byly poté udržovány v tomto indukčním mediu po celou dobu trvání pokusu.

PŘÍKLADY

Příklad 1 - Exprese HGH cDNA

Částečnou cDNA poskytl Dr.L.Hall (Bristol University). V této cDNA nebyl přítomen translační iniciační kodon HGH. Počátek tohoto genu byl znovu vytvořen zabudováním koncensního eukaryotického translačního iniciačního místa (Kozak a kol., Molecular and Cellular Biology, Vol.7, 3438-3445, 1987) za použití syntetického oligonukleotidu, který sahal od 30bp nad (5) translační startovní oblasti (ATG) až k přirozenému restričnímu místu endonukleasy AatII blízko počátku cDNA (viz obr. 4a, 4b). Kompletní HGH cDNA od místa HindIII (vneseného syntetickým oligonukleotidem) až k přirozenému restričnímu místu SmaI byla klonována do

pBLUESCRIPT. Sekvence HGH cDNA obsahující přirozené sekvence signálu sekrece HGH byly odstraněny z tohoto plasmidu jako fragment od HindIII po BamHI a klonovány do oblastí HindIII a BamHI intermediárního vektoru pUNIVEC. Tento plasmid pak obsahoval expresní kazetu cDNA HGH. Tato kazeta byla odstraněna z pUNIVEC štěpením pomocí ClaI a KpnI a byla vnesen inzerací do oblastí ClaI a KpnI plasmidu pGSE1417 za vzniku plasmidu pDCR/NEO/HGHcDNA. Tento proces je nastíněn v obrázku 4c. Sekvence DNA výsledné HGHcDNA použité v těchto experimentech je znázorněna na obrázku 5.

Plasmid pDCR/NEO/HGHcDNA byl štěpen restriční endonukleasou PvuI a lineární DNA byla poté vnesena do buněk MEL C88 pomocí elektroporace, transfekce zprostředkované fosforečnanem vápenatým nebo lipofekcí. Monoklonální transfektované buněčné linie byly selektovány způsobem popsaným výše. U každé transfektované linie byla indukována diferenciace (a tudíž exprese řízené erythroidními elementy DCR) jak bylo popsáno, a sekretovaný růstový hormon byl stanovován za použití komerční soupravy RIA (Nicholls Institute tandem-R HGH assay kit). Hladiny mRNA transfektované HGH cDNA byly stanovovány pomocí metody Northern blot s probou HGH cDNA za použití RNA myšího hlavního beta globinu jako vnitřního standardu.

VÝSLEDKY-Příklad 1

Stabilní buněčné linie exprimují a sekretují HGH s vysokým výtěžkem. Myší krvinky nejsou známy jako sekreční buňky, a proto hladina sekrece z rekombinantních klonů byla samozřejmě překvapivá. Počáteční stanovení HGH v buněčném supernatantu a buněčných lyzátech ukazovala, že více než 95% vytvořeného HGH bylo sekretováno do živného media. Sekrece (spíše než buněčná lyse) byla potvrzena použitím inhibitoru

sekrece plísňového inhibitoru sekrece, brefeldinu-A (viz obrázek 4).

Tabulka I ukazuje hladiny sekretovaného HGH získané po čtyřdenní indukci z expresním vektorem pro HGH popsáným výše. Měřeny byly nahromaděné populace i monoklonální linie.

Tab. 1 : Vylučování HGH z transfektovaných MELC88 buněk

buněčná linie	monoklonální	HGH [ug/ml]
elektroporace :		
PP1	no	1,7
PP2	no	1,9
1	yes	0,8
2	yes	1,5
3	yes	3,5
4	yes	5,0
transfekce $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$:		
PP1	ne	5,0
PP2	ne	3,5
1	ano	2,0
2	ano	12,0
3	ano	4,5
4	ano	50,0

Hladina exprese byla, ve srovnání se standardními experimenty exprese u savců (bez amplifikace), velmi vysoká. Northernový přenos (northern blot) celkové mRNA z indukovaných buněčných linií, se specifickou HGH sondou (probe), potvrdila, že hladiny mRNA chimerické globin/HGH RNA (produkované z expresního vektoru) jsou srovnatelné s hladinami endogenního myšího beta-globinu (viz Obr.6).

Příklad 2 - Exprese HGH genu

HGH gene byl připraven štěpením plasmidu pOGH, který byl získán z Nichollsova Ústavu (viz Obr.7), restrikčními endonukleázami. Restrikční fragment od EcoRI místa k BamHI místu, obsahující nativní HGH genomové sekvence pro prepis přírodní RNA od místa startu do 620 báze, byl po translokaci stop kodonu subklonován do intermediálního vektoru p BH2-X+Poly, který nemá beta-globinové intron/exon sekvence (viz Obr. 7), a který běžně obstarává sestřih a polyadenylaci pro chimerickou mRNA v našich expresních vektorech. V tomto intermediálním vektoru, expresní kazeta obsahuje promotor lidského beta-globinu vázaného na HGH genomové sekvence (intronové a exonové sekvence) a HGH polyadenylační signály. Tato expresní kazeta byla přenesena do konečného vektoru (GSE1417) jako ClaI-KpnI fragment jak bylo dříve popsáno pro HGH cDNA. Konečný expresní vektor, genomu pDCR/NEO/HGH, byl vnesen do MELC88 buněk elektroporací a monoklonální transfektantní linie a populace obsahující vektor byly

selektovány jak bylo popsáno. Jako v předcházejících případech, byly buňky každé transfektované linie rozlišeny

indukcí a vylučovaný HGH byl změřen za použití komerční RIA soupravy. Hladiny mRNA transfektovaného genu byl měřen nothernovým přenosem s HGH cDNA sondou. Hladiny myšího beta-globinu sloužily jako vnitřní kontrola.

Výsledky - Příklad 2

Jak bylo zjištěno pro expresi HGH z HGH cDNA, stabilní transfektantní buněčné linie HGH genu, exprimují a vylučují HGH ve velké množství. Tab.2 ukazuje množství vylučovaného HGH, které bylo měřeno po 4 dnech indukce

Tab. 2 - Vylučování HGH z genů přenesených do MELC88 buněk

buněčná linie	monoklonální	HGH [ug/ml]
elektroporace :		
AP1	ne	12,0
AP2	ne	7,0
1	ano	10,0
2	ano	24,0
3	ano	5,0
4	ano	3,0

Vysoká hladina exprese a vylučování HGH bylo pozorováno ve stabilně transfektovaných buněčných liniích. Množství HGH mRNA bylo měřeno nothernovým přenosem s HGH cDNA sondou a opět byly v indukovaných buňkách naměřeny hodnoty srovnatelné s množstvím myšního beta-globinu (viz Obr.8). Srovnání s množstvím myšního beta-globinu, ukazuje, že množství HGH mRNA

jsou přibližně rovna cDNA expresního vektoru (který využívá beta-globinový sestřih a polyadenylační sekvence z pUNIVC) a HGH genomovému expresnímu vektoru (který využívá přírodních HGH intronových sekvencí a polyadenylačních sekvencí). Rozdíl v množství vylučovaných bílkovin je pravděpodobně vysvětlitelný rozdíly v translaci, které vznikají z rozdílných způsobů polyadenylace obou mRNA. Rozdíly na 5'koncích (začátek) obou mRNA nepřispívá k pozorovaným rozdílům hladiny translace, poněvadž změna 5'konce HGH cDNA (stále se sestřihem lidského beta-globinu a polyadenylačními sekvencemi) s mRNA začátkem z genomického HGH expresního vektoru (viz Obr.9), neovlivnila množství ani mRNA ani bílkoviny produkovaných transfektovanou buněčnou linií.

Příklad 3 - Dlouhodobé vylučování HGH

Hladina vylučování pozorovaná u HGH cDNA nebo u genomických DNA expresních vektorů byla neočekávaná, protože červené krvinky normálně nepatří mezi sekretující buňky. K získání DCR řídicí exprese musí být MEL buňky indukovány, aby došlo k rozlišení a získaly erythroidní charakter. Tato diferenciací je komplexním procesem, který zahrnuje množství fyzikálních změn buněk a může vést k odstranění jader z buněk a selektivní degradaci mRNAs v buňkách. Funkce erythroidních buněk in vivo, jako přenašečů

kyslíku (a rozpuštěného kyslíčnicku uhličitého) dosahuje přibližně doby 120 dnů, což je srovnatelné s těmito změnami. Je obecně uznáváno, že terminální diferenciaci také resultuje ve ztrátu bílkovinného sythetického aparátu v buňce, poněvadž to je hlavně způsobeno ztrátou jádra a mRNA degradačním procesem.

Ve světle našich pokusů s vysokou hladinou vylučování, jsme testovali produkci a vylučování HGH transfektovanými MELC88 buňkami v prodloužené časové periodě. Buňky transfektované HGH cDNA expresivním vektorem byly rozlišeny indukci, jak bylo popsáno dříve. Po době asi 48 hodin, bylo induktivní medium (selektivní medium + 2% DMSO) nahrazeno (stejným objemem) a v původním mediu bylo stanoveno HGH. Medium bylo poté vyměňováno každých 24-36 hodin (aby se zabránilo odumírání buněk v důsledku vyčerpání živin) po dobu asi 80 dnů.

Výsledky - Příklad 3

Obr.10 ukazuje produkované a vylučované množství HGH během této prodloužené doby. Není zřejmé zda kolísání množství HGH, které je z obrázku patrné, vyjadřuje změny sekretovaného množství stabilní populací buněk nebo zda některé subpopulace buněk postrádají indukci při začátku experimentu a následně "dozrávají" a indukují později. Z pokusu je jasné, že indukované MELC88 transfektantní buněčné linie mohou pokračovat v produkci vylučovaného HGH alespoň po dobu 80 dní po začátku indukce. Znova podotýkáme, že se toto, vzhledem k buněčným změnám, které jsou doprovázeny terminální erythroidní diferenciací, nedalo předpokládat.

Pozorovaná doba sekrece měla za následek použití transfektovaných buněčných linií k prodloužení procesu produkce. Navíc, dlouhodobá sekrece nabízí možné využití systému k produkci sekrekčních bílkovin v krevním řečišti savců buď jako vlastní produkční proces nebo jako část protokolu genové terapie.

Příklad 4 - Inhibice vylučování

Zpráva o tom, že metabolit hub, brefeldin-A, inhibuje pohyb glykophorinu k buněčnému povrchu v MEL buňkách speciálním blokováním přechodu přes Golgiho aparát (Ulmer a Palade, PNAS, 86, 6992-6996 (1989)), umožňuje zkoumání schopností erythroidních buněk sekretovat heterologní bílkoviny.

Klon MELC88 exprimující HGH byl indukován pomocí 1,5% DMSO po dobu 3 dní a poté byl přidán 1 ug/ml brefeldinu-A v ethanolu. Kontrolní kultury obsahovaly 0,1% ethanolu. Po inkubaci při 37°C po dobu 2 hodin, byly kultury promyty dvakrát čerstvým médiem a brefeldin-A (1ug/ml) nebo ethanol (0,1%) byl přidán k pokusným resp. kontrolním kulturám. Vzorky supernatantu a buněk byly odebrány k analýze.

Výsledky - Příklad 4

Hladiny růstového hormonu v supernatantu kultur a v extraktech ze sonikovaných buněk byly měřeny za využití sendvičové imunoradioaktivní metody popsané již dříve. Vzorky byly analyzovány po 1, 2 a 4 hodině, poté co bylo medium vyměněno.

Tab.3 - Vylučování HGH z buněk ošetřených brefeldinem A

ČAS	KONTROLA		BREFELDIN-A	
	hod supernatant ng/ml	lyzát buněk ng/ml buněk	supernatant ng/ml	lyzát buněk ng/ml buněk
1	162	52,6	47,1	183
2	209	96,0	44,0	515
3	331	71,0	54,0	777

Jak je patrné z uvedené tabulky, kontrolní kultury hromadí HGH v supernatantu v závislosti na čase, zatímco v buňkách k tomuto zvýšení nedochází. Naopak nebyl pozorován žádný nárůst HGH v supernatantu a zvýšený nárůst HGH u buněčných lyzátů, u buněk ošetřených brefeldinem-A. tyto hodnoty jasně ukazují, že přítomnost HGH v supernatantu je způsobena sekrecí bílkovin přes Golgiho aparát.

Příklad - Vylučování dalších rekombinantních bílkovin - lidského PLA₂ cDNA

Sekreční pokusy popsané s HGH naznačují, že systém, který jsme popsali je schopen exprimovat a vylučovat velké množství rekombinantní bílkoviny. Povaha systému, s velmi omezenou expresí než jsou buňky indukované před konečnou diferenciací, je mnohostranná a aplikovatelná na širokou paletu

bílkovinných typů. Dokonce bílkoviny, které jsou toxické nebo působí destruktivně na buňky, mohou být exprimovány tímto systémem. Testovali jsme expresi jedné takové bílkoviny, lidské synoviální fosfolipasy A_2 , v MEL buňce sekrečního systému.

Fosfolipasa A_2 je enzym zapojený do metabolismu membránových fosfolipidů. Enzym specificky štěpí jeden z řetězců mastných kyselin fosfatidylcholinu nebo fosfatidyl ethanolaminu v buněčných membránách za současného uvolnění arachidonové kyseliny (která je částí metabolismu zánětů). Zůstávající lyso-fosfolipidy mají v buněčné stěně funkci detergentů. Exprese fosfolipasy A_2 ve zvířecích buňkách je pravděpodobně omezena díky destruktivnímu vlivu PLA_2 na tvorbu buněk. K dnešní době byla publikována nejvyšší hladina exprese >200 ng/ml, v amplifikovaných CHO buňkách (Kramer a kol., J.Biol.Chem. 264, 5768-5775, 1989).

Abychom mohli exprimovat lidskou PLA_2 v našem expresním systému MEL buňky, museli jsme nejdříve klonovat PLA_2 z lidské plicní cDNA knihovny za použití techniky PCR (polymerase chain reaction). Použité PCR amplimery a PLA_2

cDNA sekvence jsou ukázány na Obr.11. cDNA byla potom subklonována do intermediálního plasmidu pUNIVEC jako je EcoRI až Sali část (v EcoRI a XhoI místech pUNIVEC). Expresní kazeta byla potom přenesena jako ClaI až KpnI část do pGSE1417, jak bylo popsáno dříve.

Transfektantní buněčné linie byly generovány jak bylo popsáno dříve, s následující indukcí, supernatanty byly testovány na PLA_2 aktivitu.

Výsledky - Příklad 5

Indukované, transfektované MELC88 kultury byly tetsovány na přítomnost fosfolipasové aktivity dvěma metodami. První (viz Pepinski a kol., J.Biol.Chem. 261, 4239-4246, 1986) používá membrány E.coli, značené in vivo [³H] olejovou kyselinou jako substrátem a druhá (viz Seilhamer a kol., J.Biol.Chem. 264, 5335-5338, 1989) používá fosfatidylcholinu nebo fosfatidylethanolaminu jako substrátů pro PLA₂. Supernatanty z transfektovaných MEL buněčných klonů byly aktivní v obou stanoveních a (protože druhé stanovení dávalo více reprodukovatelné výsledky) dávaly hladiny exprese přibližně 200 ng/ml. Lze konstatovat, že bez dalšího prodlužování optimalizačních studií, transfektované MEL buňky vylučují zrovna tolik aktivní rekombinantní lidské fosfolipasy A₂ jako jsou nejlepší publikované výsledky do dnešní doby (Kramer a kol., J.Biol.Chem. 264, 5768-5775, 1989) při použití amplifikované exprese v CHO buňkách, ale v podstatně kratší době.

Příklad 6 - Exprese PLA₂ za použití nativních PLA₂ genomických sekvencí

PLA₂ genomové sekvence byly izolovány jako 6,2 kb HindIII fragment z lidské placentální DNA genomové knihovny (Clontech Ref. HL1067J) za použití klonované PLA₂ cDNA jako sondy. Tento klon byl charakterizován štěpením restrikcčními enzymy, čímž bylo prokázáno, že obsahuje PLA₂ genomové sekvence. Celý fragment (obsahující PLA₂ kodující a vložené DNA sekvence, polyadenylační místa a přibližně 1,5 kb sekvencí v protisměru (5') údajného promotoru prvního exonu) byl klonován do vektoru pGSE1417. V tomto plasmidu je exprese PLA₂ sekvencí řízena nativním PLA₂ promotorem. Plasmid byl linearizován restrikcčním štěpením PvuI a zaveden do MELC88 buněk, jak bylo popsáno dříve. Společné populace a

monoklonální linie byly selektovány a indukovány a hladina vylučované PLA₂ byla měřena jako v předcházejících případech.

Výsledky - Příklad 6

Exprese PLA₂ z PLA₂ promotoru (měřeno množstvím bílkoviny (viz Tab.4A níže) nebo množstvím RNA (viz Obr.13)) byla prokazatelně vyšší než hladina exprese naměřena s PLA₂ cDNA za použití lidského beta-globinového promotoru. Nejvyšší hladina sekrece byla 2,5 ug/ml, což je o řád vyšší než hladina získaná při použití konvenčních CHO/DHFR systémů. Rozdíl mezi hladinami exprese s PLA₂ cDNA a genomovými sekvencemi je pravděpodobně následkem vyšší stability mRNA získané z genomového templátu, neboť náhrada lidského beta-globinového promotoru za lidský PLA₂ promotor v PLA₂ genovém konstrukt, viditelně neovlivňuje hladinu vylučované PLA₂. Výsledky exprese PLA₂ genomové sekvence za použití beta-globinového promotoru jsou uvedeny v Tab.4B.

Tab.4 - Stanovení PLA₂

Vzorek	Monoklonální	ug/ml
A. PLA ₂ gen s PLA ₂ promotorem		
PP1	ne	1,5
PP2	ne	1,5
1	ano	2,3
2	ano	2,5
3	ano	0,9
4	ano	1,6

B. PLA₂ gen s lidským beta-globinovým promotorem

PP	ne	0,34
1	ano	1,72
2	ano	1,10
3	ano	0,38
4	ano	1,66

Příklad 7 - Exprese HGH v MEL11A21 buňkách

Ukázali jsme, že MELC88 buňky jsou schopné účinné sekrece rekombinantních bílkovin. Pro jednodušší purifikaci a opětné získání rekombinantní bílkoviny, jsme také testovali expresi v jiné, myší buněčné linii erythroleukemických buněk. MEL buněčná linie 11A21 je udržovaná v neselektivním mediu s 1% zárodečného telecího sera, jak bylo popsáno. Redukce obsahu sera z 10% na 1%, silně redukuje obsah kontaminujících bílkovin v konečném preparátu a usnadňuje čištění bílkoviny. Exprimovali jsme HGH v 11A21 buňkách. Expresní vektory pDCR/NEO/HGHcDNA a pDCR/NEO/HGH genomové jsou popsány již dříve. Transfekce a selekce probíhaly tak, jak bylo popsáno dříve pro MELC88, kromě toho, že bylo používáno 1% serum. Indukce probíhala tak, jak už bylo popsáno, kromě toho, že indukující medium pro 11A21 transfektantní buňky obsahovalo zárodečné telecí serum a alfa MEM.

Výsledky - Příklad 7

Tab.5 ukazuje hladiny vylučované HGH sledované na indukci 11A21 transfektantních buněčných liniích. Po přepočtu na počet buněk, tyto buňky, zrovna tak jako C88

transfektantní buňky vylučují indikují, že vektory mohou řídit expresi a, jestliže je příležitost, sekreci v rámci buněk MEL typů.

Tab.5 - HGH exprese u 11A21 transfektantů

Buněčná linie	Monoklonální	HGH ug/ml
PP1	ne	1,2
PP2	ne	1,0
1	ano	2,0
2	ano	0,9
3	ano	0,6
4	ano	1,2

Příklad 7b - Expese HGH cDNA řízené PLA_2 promotorem

Expese lidského růstového hormonu cDNA pod kontrolou PLA_2 promotoru bylo dosaženo následovně .

PLA_2 promotor byl izolován z lidské DNA za použití PCR metody jak bylo popsáno výše (Příklad 5). PLA_2 promotor byl získán jako 200bp fragment za použití následujících PCR apmlimérů (SEQ ID NO.3, a NO.4)

5'oligonukleotid = 5' TCCGCATGCTCAACTCTGTCCTGGCCAGGCTGA 3'
SphI

3'oligonukleotid = 5' CAGAAGCTTCCAGAGTTGTATCCCCAGGCCGTC 3'
HindIII

PCR produkt byl použit k náhradě lidského beta-globinového promotoru v pEC3 (SphI-HindIII), za vzniku nového vektoru pEC4, do kterého byla cDNA lidského růstového hormonu klonována za využití HindIII-BamHI míst. Konečný expresní vektor byl vytvořen přenesením ClaI-Asp718 kazety pEC4 do pGSE1417, za vzniku pGH. 4GSE.

Supernatanty z buněk indukovaných čtyři dny byly testovány na růstový hormon. Vzorky: hGH508, pozitivní kontrola hGH cDNA po směru beta-globinového promotoru, PP1 a PP2, směsné populace, 1-4 jednotlivé klony.

Vzorek	Indukce I (ug/ml)	Indukce II (ug/ml)	Indukce III (ug/ml)
hGH 508	17,3	15,0	18,4
PP1	7,3	9,0	9,6
PP2	9,9	11,7	14,9
1	6,5	3,2	8,9
2	6,3	7,0	9,2
3	1,9	2,4	3,1
4	12,7	-	25,6

Příklad 8 - Stabilita sekreční hladiny po dlouhodobé kultivaci

Hlavní nedostatek expresního systému založeného na amplifikaci, je stabilita amplifikovaných sekvencí. Do nedávna se všeobecně předpokládalo, že amplifikované sekvence integrované do genomu by měly být stabilní bez problémů. Avšak údaje z průmyslové výzkumné skupiny ukazují, že takové amplifikace mohou být nestabilní dokonce v přítomnosti specifického prostředí (Weidle U.H. a kol., Gene, 66, 193-203 (1988)). Tyto problémy by měly být vyloučeny při používání DCR expresního systému, poněvadž u něho není nutné velké množství kopií pro dosažení vysoké hladiny exprese.

Pro ověření této hypotézy, bylo pět klonů odvozeno od vysokou produkční buněčné linie D50 mnohonásobným limitovaným zředovacím klonováním. Klony byly pasážovány více než 40 generací se selekčním tlakem G418 a bez něho. V důsledku možných změn v inducibilitě klonů, produktivita byla zjistitelná srovnáním s neindukovanými klony buněk. Během prodlouženého růstu bez selekce nebyla pozorována žádná změna produktivity, což ukazuje na to, že konstrukt exprese v buňkách byl stabilní.

Příklad 9 - Stabilita RNA produkované expresním vektorem

Jak již bylo popsáno dříve (viz Příklad 3), erythroidní diferenciace je komplexní proces, který zahrnuje mnoho kroků a vyústuje v selektivní degradaci mnoha mRNA v buňce. pro uchování vysoké hladiny exprese heterologních cDNA nebo genů, heterologní mRNA musí být stabilní v indukovaných červených krvinkách. Aby byla zachována celistvost mRNA v indukovaných buňkách, používali jsme části 3' konců beta-globinu mRNA v našich cDNA expresních konstruktech. Tento stabilizující efekt může být také zajištěn částmi 3' konců jiných genů, které produkují stabilní informaci v indukovaných červených krvinkách (např. HGH nebo PLA₂), ale nemůže být zajištěn geny, které produkují vysoce nestabilní mRNA v indukovaných

buňkách (např. myši H2K). Obr. 13 a 14 ilustrují tento příklad a srovnávají heterologní PLA_2 informaci (z různých konstruktů) s endogenní glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázovou (GAPDH) mRNA. PLA_2 zůstávají stabilní v indukovaných buňkách, ale GAPDH mRNA je degradována ve všech indukovaných vzorcích.

Příklad 10 - Exprese lidského růstového hormonu v pEC_3

pEC_3 je shodné s pEC_2 , až na to, že obsahuje delší oblast beta-globinové 3'postranní DNA než pEC_2 (tj. až k místu přírodního XbaI místa na bázi 4845) v globinovém genu a různá polyvazebná klonovací místa mezi HindIII a BamHI místy na pEC_1 polylinkeru.; HindIII, EcoRI, XhoI, BalI, SalI, NotI a BamHI.

Hgh cDNA byl subklonován do pEC_3 (HindIII/BamHI) potom ClaI/Asp718 fragment z tohoto klonu byl subklonován do pGSE1417. Transfekce, indukce, RNA analýza a hGH analýzy byly prováděny stejně jako v předcházejících případech. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 22.

6 klonů a 2 populace, každou pro pEC_2/hGH - pEC_3/hGH

exprimující buňky, byly indukovány a testovány na hGH expresi. Výsledky ukazují, že hladina hGH je větší s EC_3 než s EC_2 . Tedy konstrukt s delším 3' koncem dává vyšší hladiny hGH. To by mohlo být (ačkoliv my si nepřejeme být omezeni touto teorií) způsobeno tím, že delší 3'konec zlepšuje translační schopnost.

Příklad 11 - Hlavní základní bílkovina (MBP)

Exprimovali jsme MBP cDNA (viz McGrogan a kol.,

J.Exp.Med.,1988, 168, 2295-2308, a Barker a kol., Gene, 1990, 86, 285-289) za použití expresivního vektoru pEC₃. MBP cDNA byl subklonován jako BamHI fragment do pEC₃, potom ClaI/Asp 718 fragment z tohoto konstruktů byl subklonován do pGSE1417.

Transfekce, indukce a RNA analýzy byly prováděny jako v předchozích příkladech, Výsledky jsou znázorněny na Obr.15.

Supernatanty z indukovaných klonů 2a a 2e byly použity ve stanovení smrtícího efektu na buňky E.coli (viz Obr.16) za použití vhodné metody stanovení jako je metoda založená na metodě Gleicha a kol., J.Exp.Med.,1974, 140, 313-332. V tomto případě je postup stručně popsán dále.

Kultura E.coli, kultivována přes noc, (např. E.coli DHSalfa) byla odstředěna při 10Kpm 1 minutu, potom resuspendována v 1 ml destilované vody. 10 ul této kultury bylo smícháno s 90 ul supernatantu MEL buněk a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Vzorky byly seriově ředěny a potom v bodech nanášeny na povrch L-media v Petriho miskách.

Příklad 12 - TNF alfa receptor

Rozpustná extracelulární část TNF alfa receptoru(A) (viz European Patent Application No.422,339) byla exprimována v Mel C88 buňkách subklonováním cDNA a fragment DNA kodující "CMYC přívěsek" (část CMYC cDNA, která koduje aminokyseliny, na které se váže monoklonální protilátka) v pEC₃ (BamHI) a potom v pGSE1417.

Transfekce, indukce a analýza RNA byly prováděny jako v předcházejících příkladech. Výsledky jsou znázorněny na Obr.17.

10 klonů bylo indukována a byla měřena hladina TNFalfa receptoru za použití vazby anticmyc-protilátka (viz Obr.18) a jejich schopnost vázat TNFalfa byl měřen za použití protilátky proti TNF (Obr.18).

Příklad 13

NK₂ receptor cDNA (Graham a kol., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 177 No.1, 8-16) byl subklonován do PEC₃ a potom ClaI/Asp718 fragment z tohoto konstruktů byl subklonován do GSE1417 za vzniku plasmidu pGSE 1417/hNK-2R (10Kb). Po růstu v E.coli a linearizaci, byl výsledný konstrukt používán k přenosu do MELC88 buněk. Exprimující klony byly selektovány s G418 a indukovány s DMSO.

Transfekce MEL buňky

Mell C88 buňky byly elektroporovány s PvuI linearizovaným GSE1417/hNK-2R. Po selekci s G418, 6 jednotlivých kolonií bylo přeočkováno a zbytek byl smíchán tak, aby vznikly dva smíchané klony. U nich se nechalo proběhnout 3-4 dělení, aby byla jistota, že mají resistenci vůči G418. Po následující indukci s 2% DMSO rostly buňky 4 dny před odstředěním jak za přítomnosti tak za nepřítomnosti 50ul protilátky k NK2 receptoru. Pelety buněk byly následovně použity ke stanovení vazby, přípravy RNA pro nothernový přenosy a SDS/PAGE analýzu.

Nothernový přenos

20 ul celkové RNA izolované z každého klonu bylo elektroporováno a přenos byl proveden s lidským NK-2 receptorem cDNA. Přenos byl znova proveden s 200bp fragmentem z intronu 2 myšního beta-globinového genu. Obr.20 ukazuje 4

hod expozice RNA, připravené z transfektantů MEL buněk, se s hNK-2R v nothernovém přenosu. Je zřejmé, že hNK-2R mRNA se jeví jako dva odlišné druhy 1,6kb a 3 kb. Tyto proužky nejsou přítomny v RNA z netransfektovaných indukovaných a ko-transfektovaných neindukovaných MEL C88 kontrol. Klon 2 tedy nevykazuje detegovatelné hladiny hNK-2R transkripce a to je ve shodě s velmi nízkými hladinami detegovatelné navázané NKA. Výskyt 2 NK-2R hybridizačních proužků je příznačný pro přítomnost jak sestřihané tak nestřihané mRNA. Obr.19 ukazuje stejný přenos vystavený, 3 hodiny po hybridizaci se sondou, beta-globinu. To ukazuje na to, že

ustálený stav hladiny mRNA hNK-2R je ekvivalentní ustálenému stavu mRNA myšího globinového genu.

Stanovení vazby NKA

Částečně purifikované membrány z MEL buněčných pelet byly použity v ^{125}I Neuro-kinin A (NKA) stanovení vazby (NKA v koncentraci 100nM) (Tab.3)

Tabulka 3

	- protilátka I^{125} NKA vazba (fmol/mg)	+ protilátka I^{125} NKA vazba (fmol/mg)
1	329,69	990,87
2	1,49	252,87
3	201,85	311,20
4	154,11	304,41
5	170,90	265,00
6	106,85	137,90
104	91,53	137,54
105	118,67	8,46
MelC88 indukované	11,20	18,11
MelC88 neindukované	0	-

Výsledky ukazují, že klon 1 exprimuje hNK-2R v nejvyšším množství jak v přítomnosti protilátky, tak v její nepřítomnosti. Exprese v přítomnosti protilátky (antagonist) je v této buněčné linii třikrát vyšší. Přítomnost protilátky má rozdílný vliv na detegovatelnou vazebnou aktivitu. Kontroly ukazují na nízké pozadí vazby NKA v tomto stanovení.

Příklad 14 - Lidský serový albumin

Lidský serový albumin(HSA) cDNA (viz, např. Sargent a kol., Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,1981,78,243-246) byl subklonován do pEC3 a potom ClaI/Asp 718 fragment byl přenesen do pGSE

1417.

Transfekce, indukce a analýza RNA byly proáděny jako v předcházejících případech. Exprese HSA v Mel buňkách byla zjištěna.

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO: 1 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE:

- (A) DÉLKA : 65 + 58 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC: dvouvláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

AGCTTGAATT CCCCGGGTCT AGAGCGGCCG CCTCGAGGGA TCCCTGCAGG 50
ACTTAA GGGGCCCAGA TCTCGCCGGC GGAGCTCCCT AGGGACGTCC 46

TACCATCGAT 65
ATGGTAGCTA C 58

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 33 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE : lineární

TCCGCATGCT CAACTCTGTC CTGGCCAGGC TGA 33

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 34 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE : lineární

CAGAAGCTTCCAGAGTTGTA TCCCCAGGC CGTC 34

- 48 -

PRIL.	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	049464	č.j.
		28. VIII 92	hosto

PATENTOVÉ NÁROKY

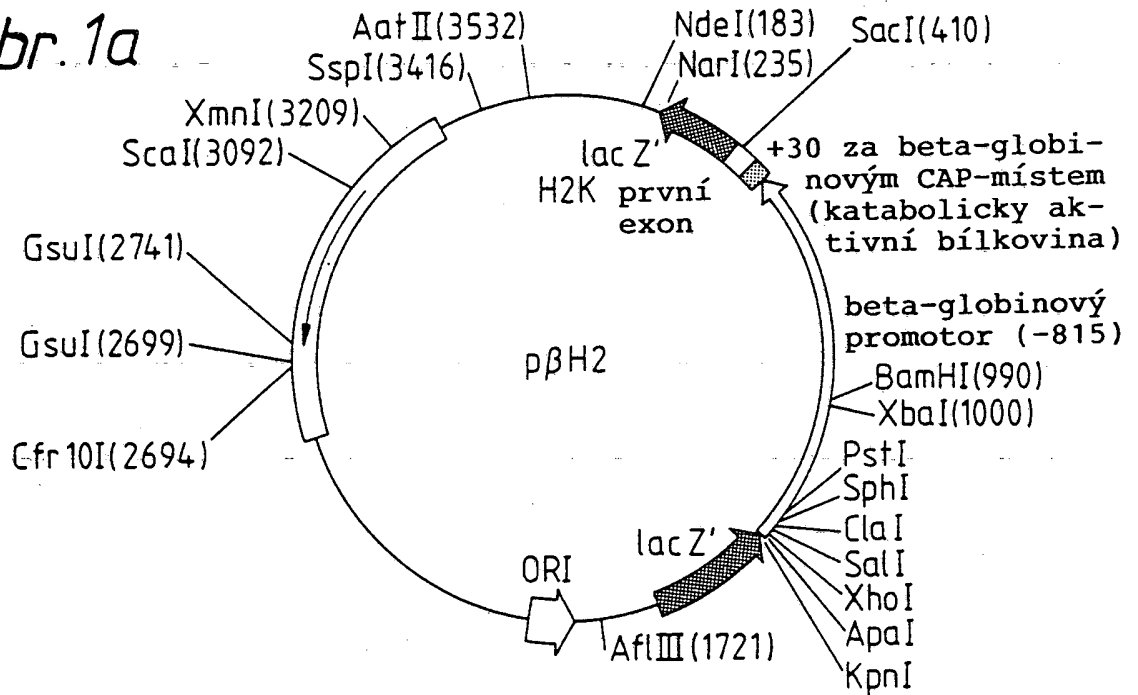
1. Expresní systém, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje savčího hostitele, transformovaného vektorem, který obsahuje promotor, DNA sekvenci, která koduje žádaný heterologní polypeptid a dominantní kontrolní oblast.
2. Expresní systém podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že savčí hostitel obsahuje erythroidní buňky.
3. Expresní systém podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že promotor obsahuje heterologní promotor.
4. Expresní systém podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vektor obsahuje vektor definovaný v kterémkoliv z nároků 5 až 12.
5. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje promotor, dominantní kontrolní oblast, DNA sekvenci, která koduje požadovaný polypeptid a DNA sekvenci, která je schopná propůjčit stabilitu mRNA vznikající přepisem uvedené DNA sekvence, která koduje požadovaný polypeptid
6. Vektor podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA sekvence, která koduje požadovaný polypeptid, obsahuje cDNA, a DNA sekvence, která je schopná propůjčit stabilitu mRNA, je vázaná na cDNA tak, že vzniká hybridní mRNA.
7. Vektor podle nároků 5 nebo 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA sekvence, která je schopná stabilizovat mRNA obsahuje beta-globinový gen nebo jeho část.
8. vektor podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA sekvence, která je schopná stabilizovat mRNA, obsahuje exon 2 nebo jeho část, intron 2 a exon 3.

9. Vektor podle nároků 7 nebo 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA sekvence, která je schopná stabilizovat mRNA zahrnuje 3'konec beta-globinového genu nebo část 3' konce.
10. Vektor , v y z n a č u j í c í s e t í m, že se používá při přípravě polypeptidu v savčím hostiteli, tak, že polypeptid je sekretován z hostitelských buněk, uvedený vektor obsahuje promotor, dominantní kontrolní oblast a gen kodující požadovaný polypeptid, za předpokladu, že gen není beta-globinový gen.
11. Vektor podle nároků 5 nebo 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dominantní kontrolní oblast je odvozena od lokusu beta-globinového genu.
12. Vektor podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dominantní kontrolní oblast obsahuje mikro lokus, který obsahuje 6,5 kb fragment, který může být získán ligací fragmentů:
- 2,1 kb XbaI - XbaI
 - 1,9 kb HindIII - HindIII
 - 1,5 kb KpnI - BgIII a
 - 1,1 kb část SacI z beta globinového genu.
13. Způsob přípravy expresního systému podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje sáčího hostitele transformovaného vektorem , definovaným podle nároku 5 nebo podle nároku 10.
14. Způsob přípravy polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená metoda obsahuje kultivaci expresního systému podle nároku 1.

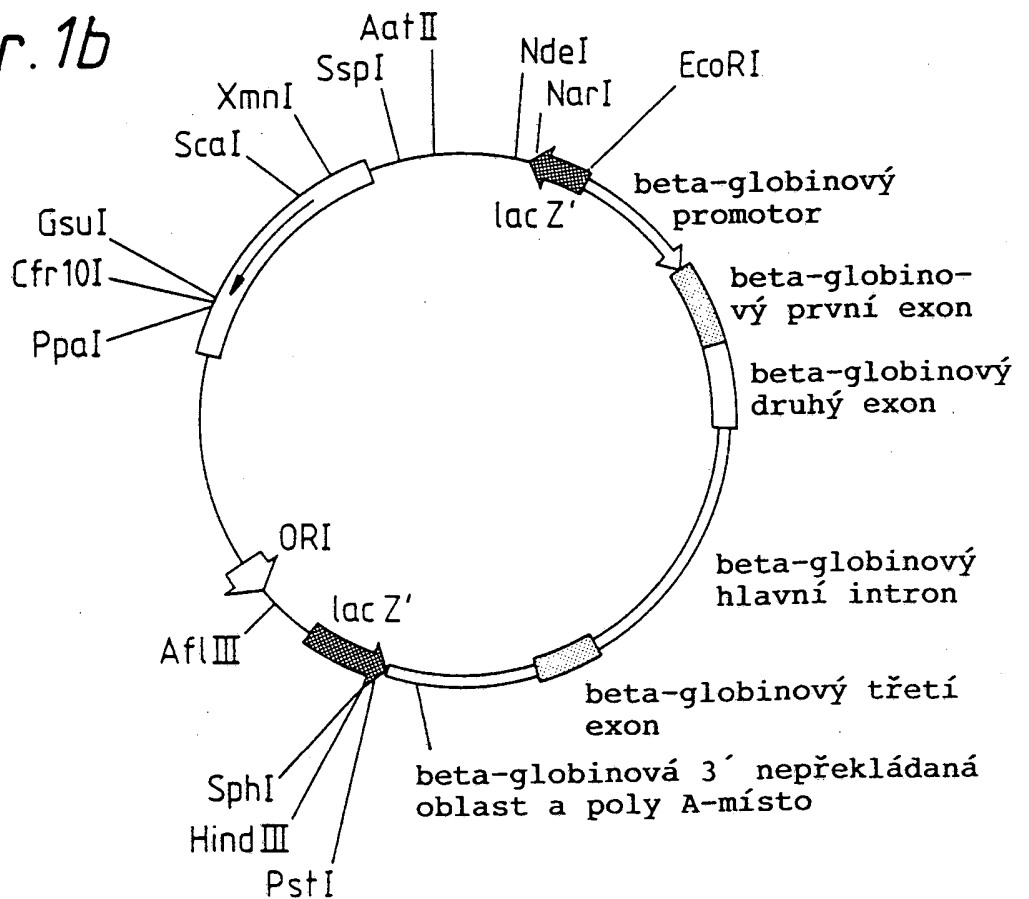
15. Způsob přípravy polypeptidu v savčím hostiteli, v y z n a-
č u j í c í s e t í m, že polypepid je sekretován z hosti-
tele, uvedená metoda zahrnuje kultivaci erythroidních buněk
transformovaných vektorem podle nároku 10.

ÚŘAD
 PRO VYNÁLEZY
 A OBJEVY
 28. VIII 92
 049164
 BOSTO

Obr. 1a

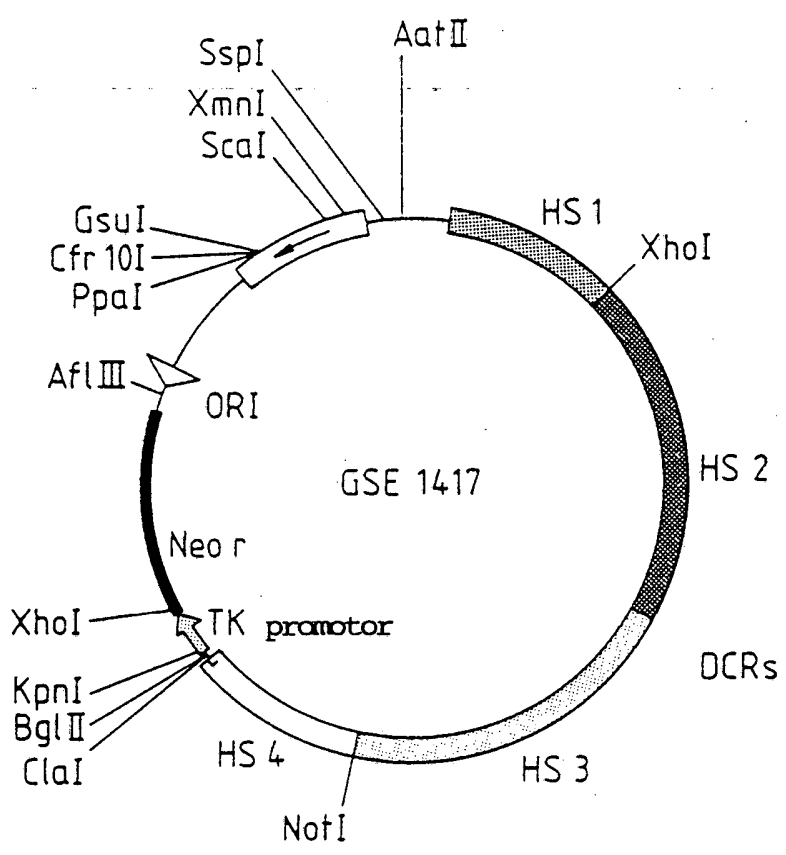


Obr. 1b



č.j. 049164
 28. VIII 92
 ÚŘAD
 PRO VYHÁLEŽKY
 A OBJEVY
 PRIL.

Obr. 1c.

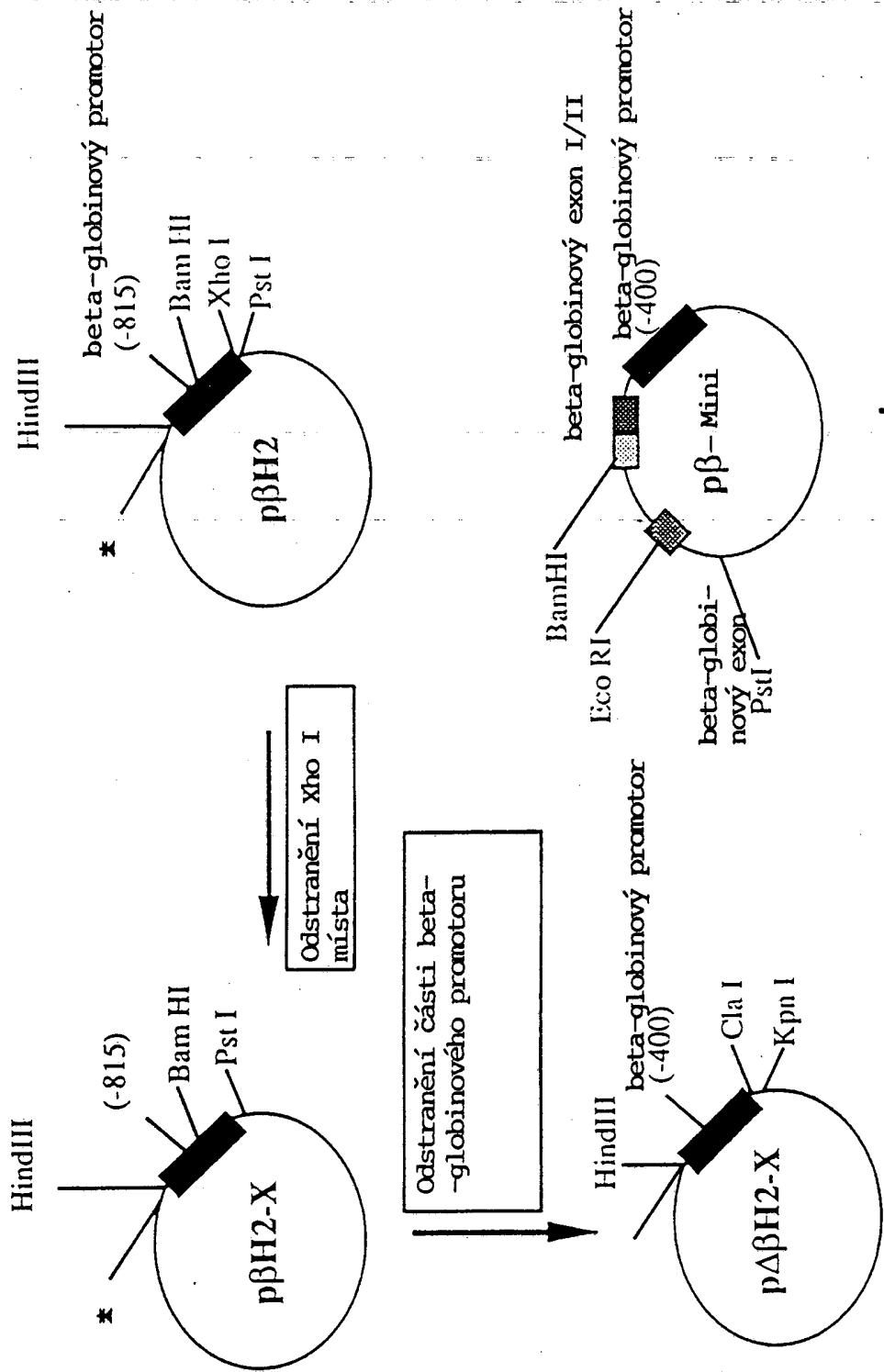


Schematický diagram plasmidů betaH2, beta-Mini a GSE 1417

I. S. Čunt
 JUDr. Jarmila Trzela

Vysvětlivka: * +30 za beta-globinovým CAP-
místem (místo pro katabolicky
aktivní bílkovinu)

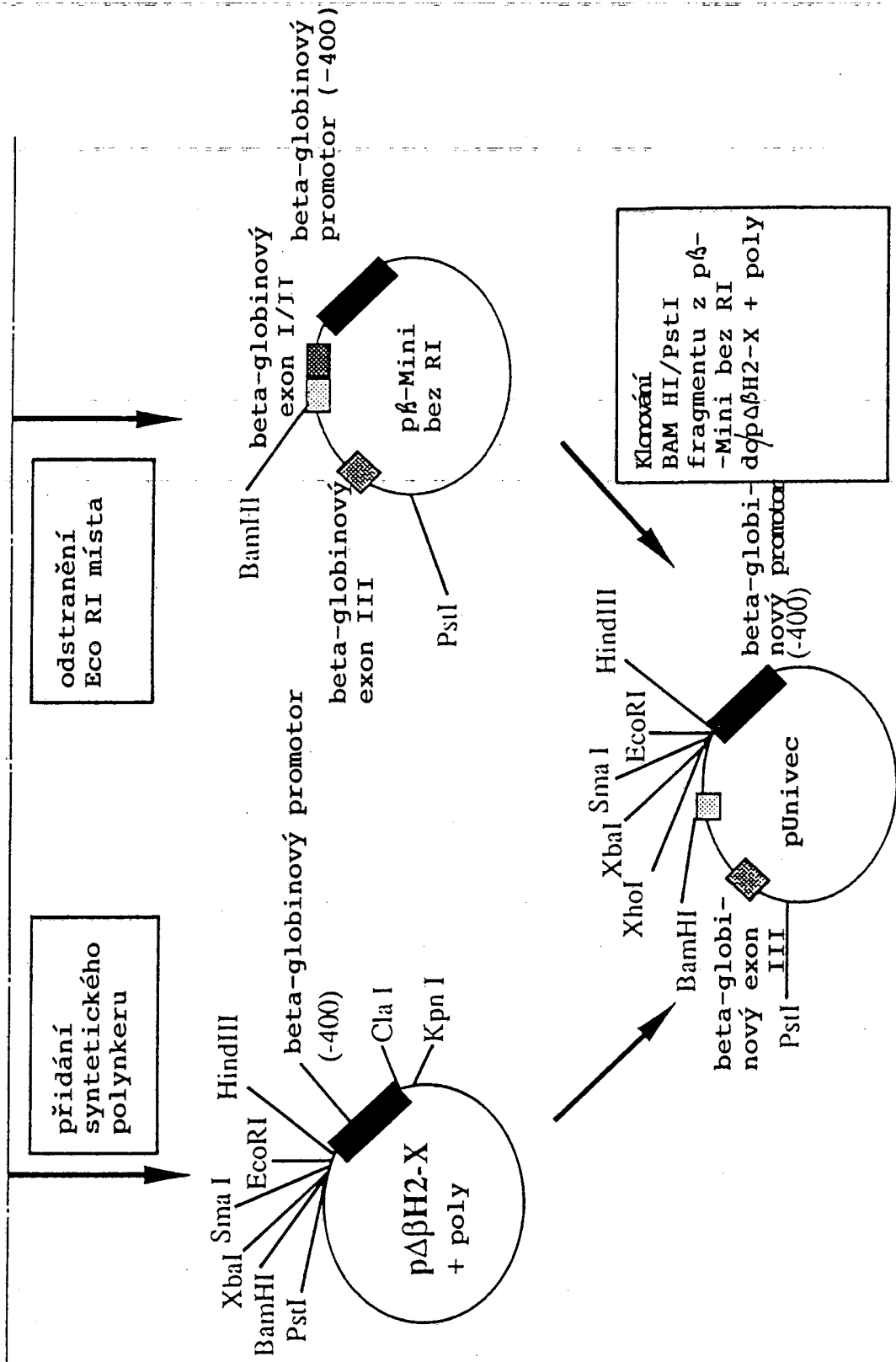
Obr. 2.



Čj. 049464
 28. VIII 92
 ÚŘAD
 PRO VYNALEZY
 A OBJEVY
 PŘIL.

i. c. Kubáň

Obr. 2 (POKRAČ.)

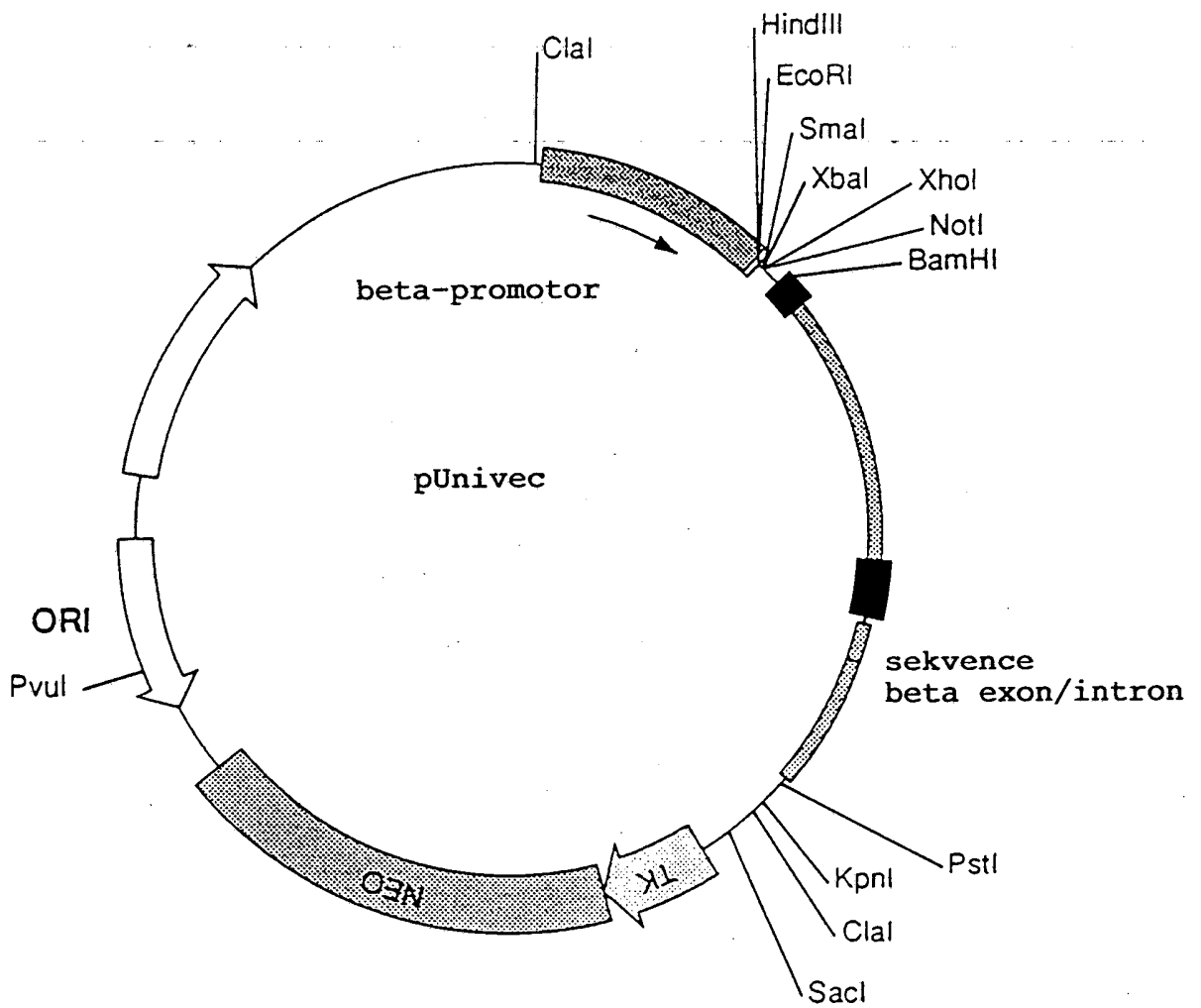


Konstrukce (příprava) plasmidu p $\Delta\beta$ H2-X + poly

049461
 ÚŘAD
 PRO VYNNÁLEZY
 A OBJEVY
 28. VIII 92
 PRIL.

J. J. Černý

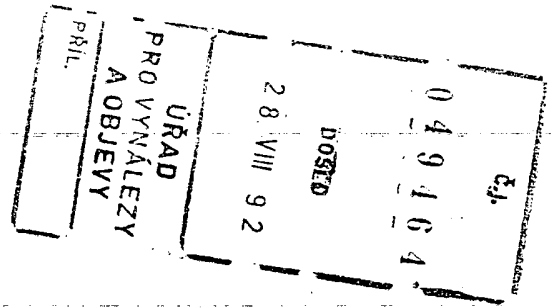
Obr. 3



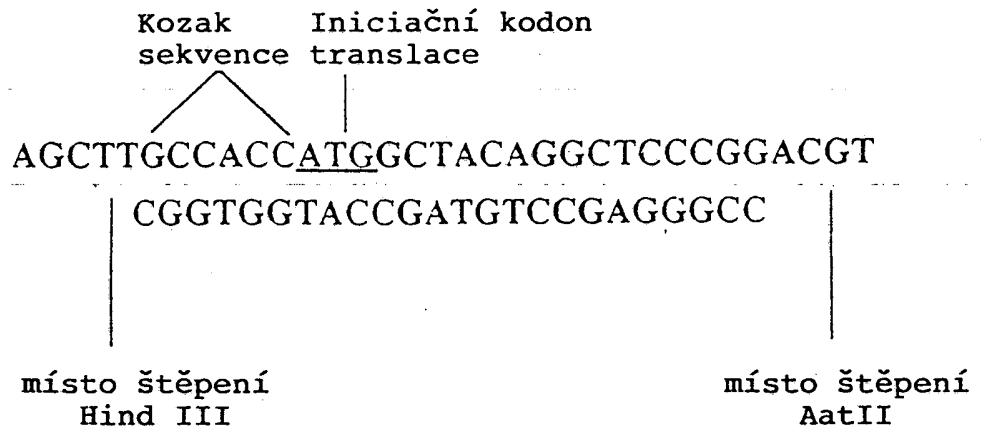
Mapa plasmidu pUnivec

PRIL.	ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	049464	č.j.
		28. VIII 92	DOSTA

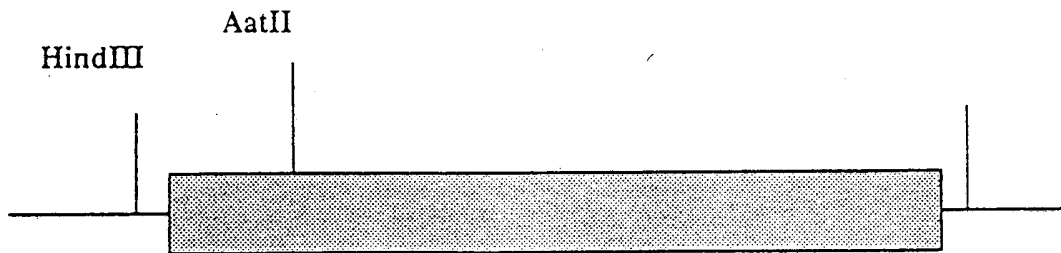
I. S. Kubík
SUDr. Jarmila Trnava



Obr. 4a.



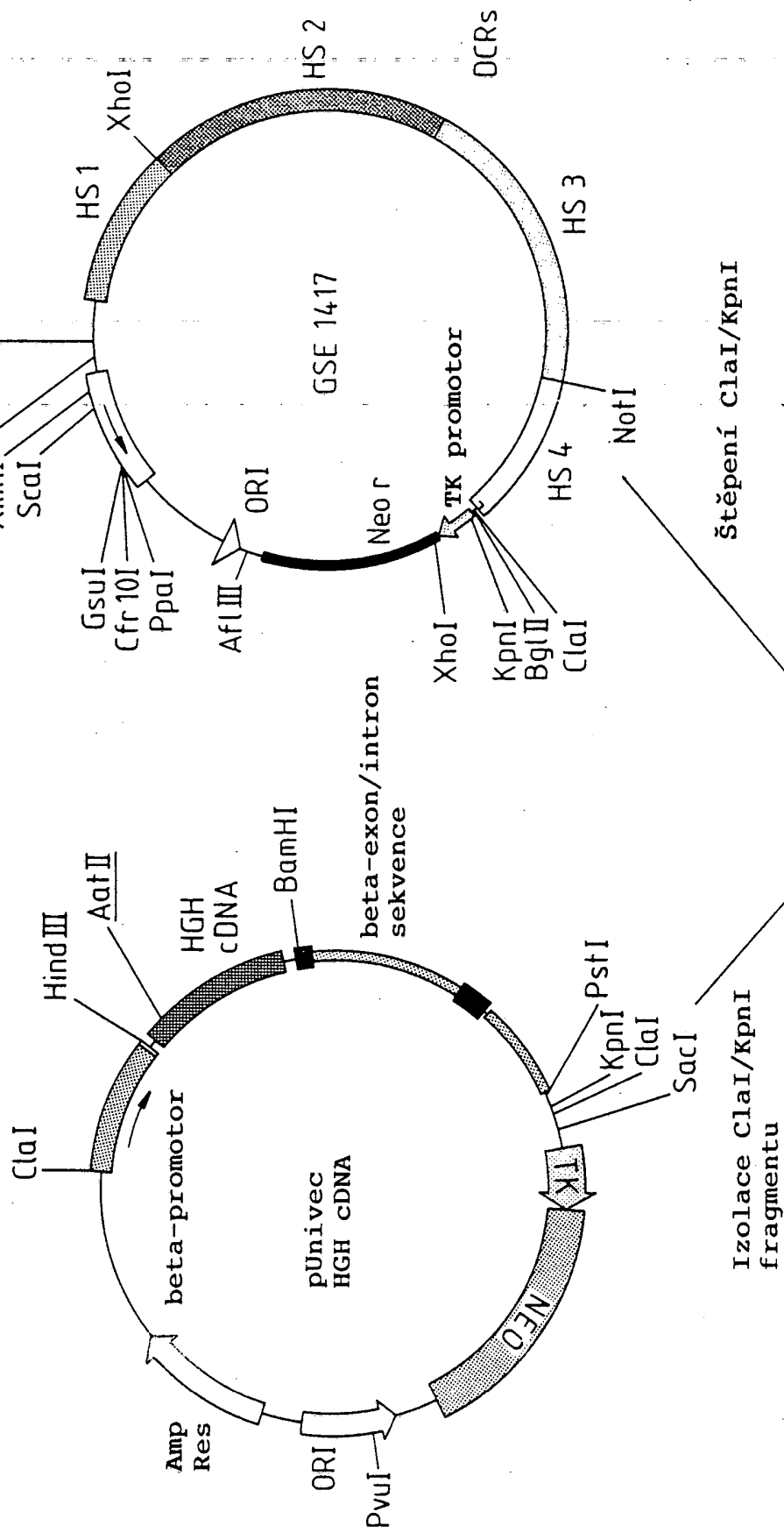
Obr. 4b.



Oligonukleotidy

- Sekvence oligonukleotidů používané na přestavbu 5' konce HGHCdNA
- Inserce oligo do 5' konce HGH cDNA

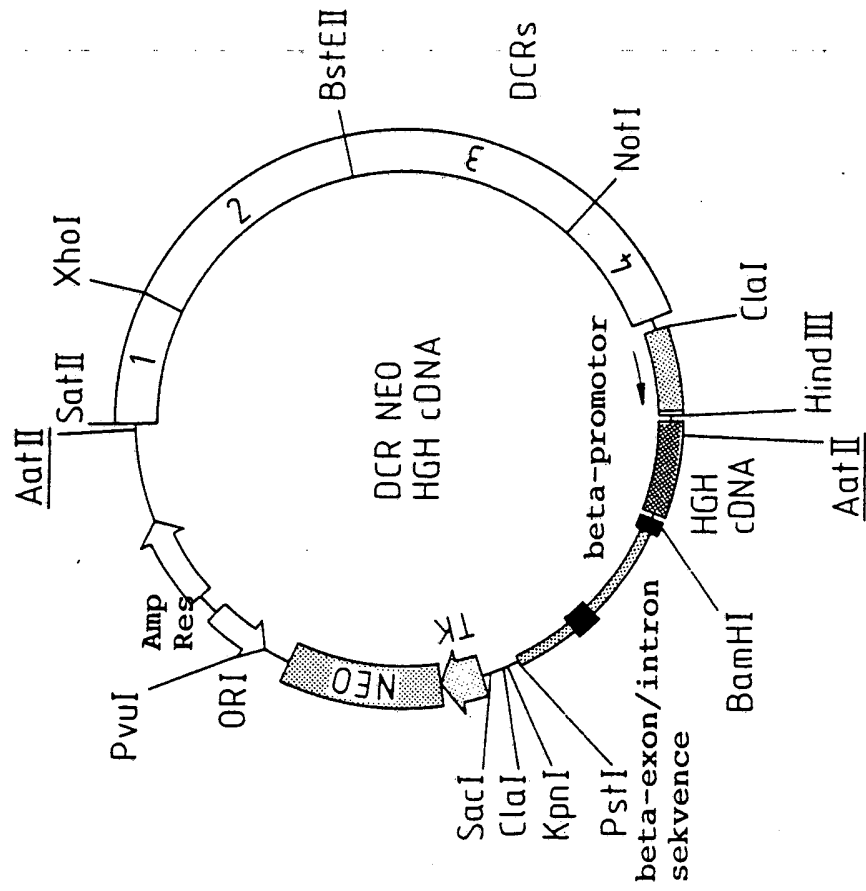
Obr. 5



049164
 28. VIII 92
 ÚŘAD
 PRO VYVÁLEZY
 A OBJEVY
 28. VIII 92

r. 2005

Obr. 5 (POKRAČ.)



Klonování kompletní HGH cDNA/globinové kasety do GSE1417

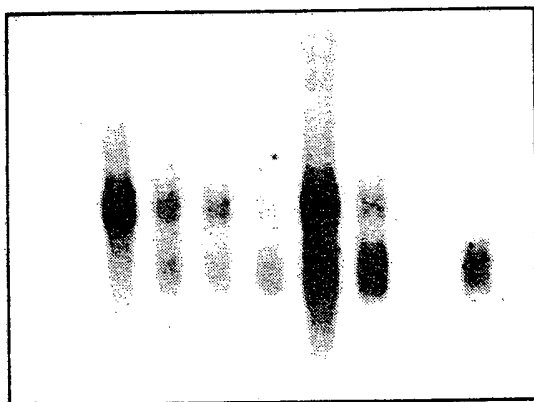
049164
 28. VIII 92
 DOŠTO
 ÚŘAD
 PRO VYVÁŽENÍ
 A OBJEVY
 PRIL.

i. r. Kubst

Pril.
URAD
PRO VYMALEZY
A OBJEVY
28 VIII 92
DOSID
049464
Ej.

Obr. 6.

A B C D E F G H

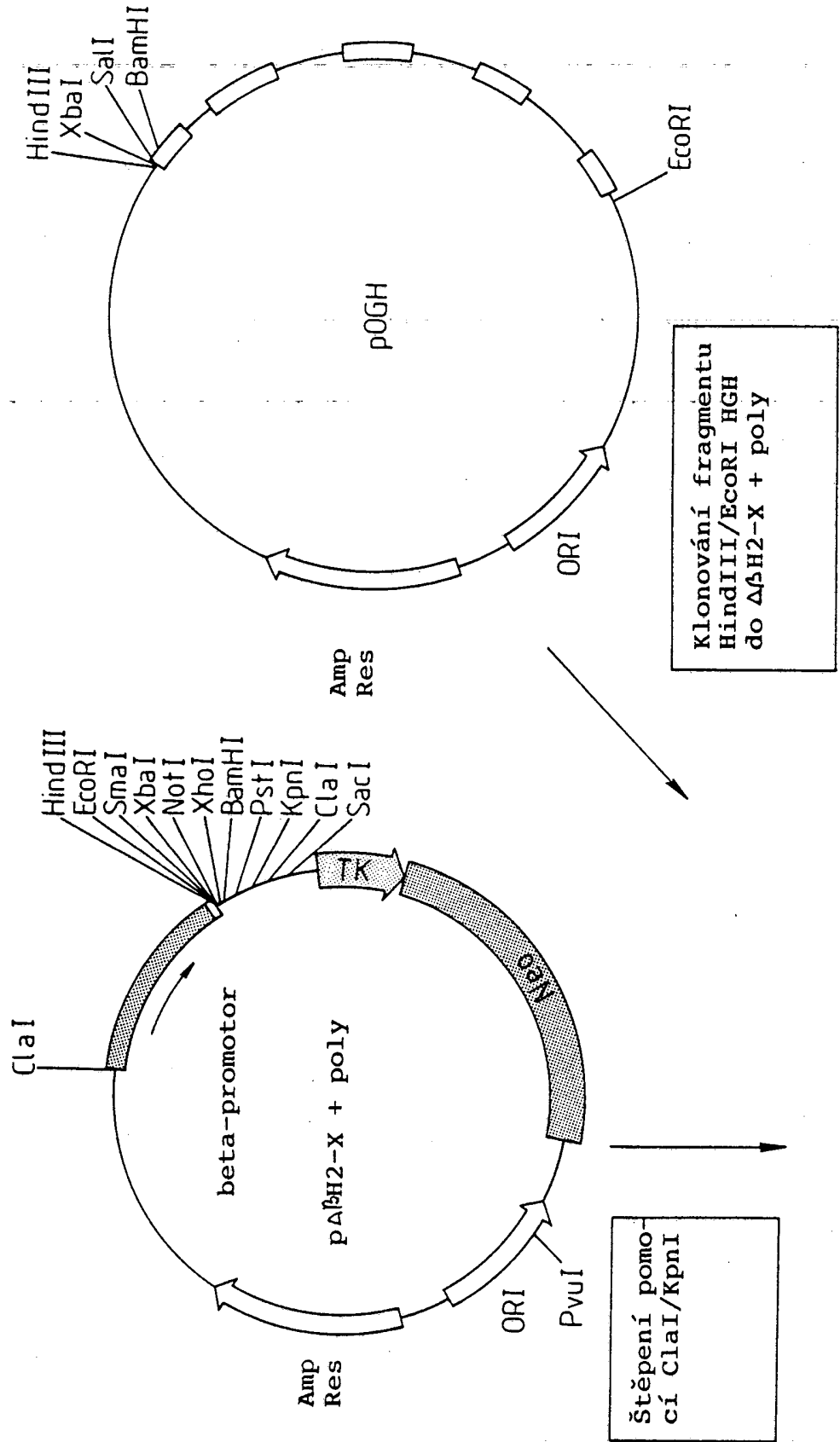


(i)

(ii)

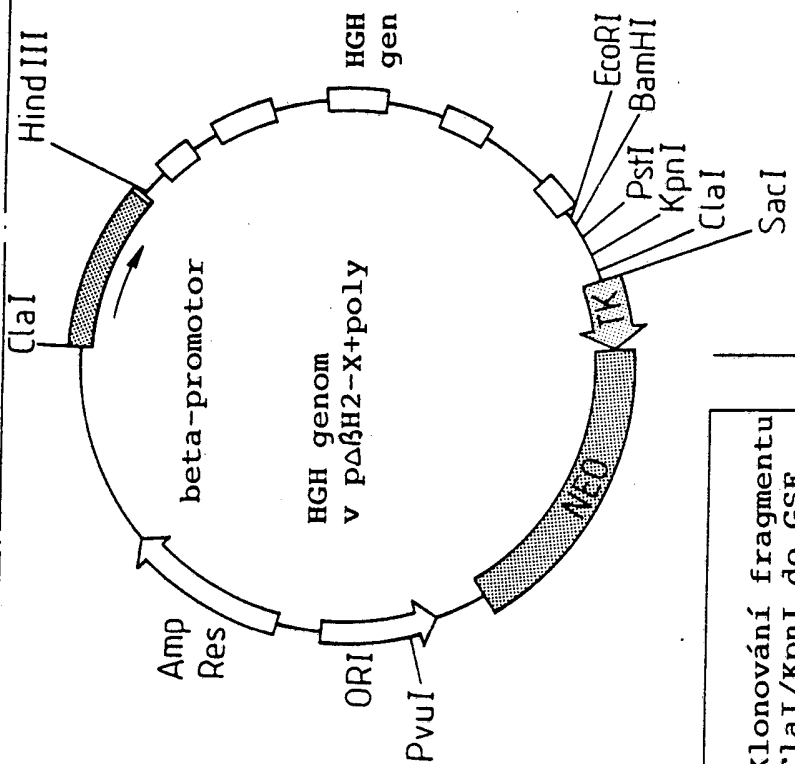
1.1. Kunt

Obr. 7



ÚŘAD
PRO VYHLEDÁVÁNÍ
A OBJEVY
28. VIII 92
DOŠLO
149164

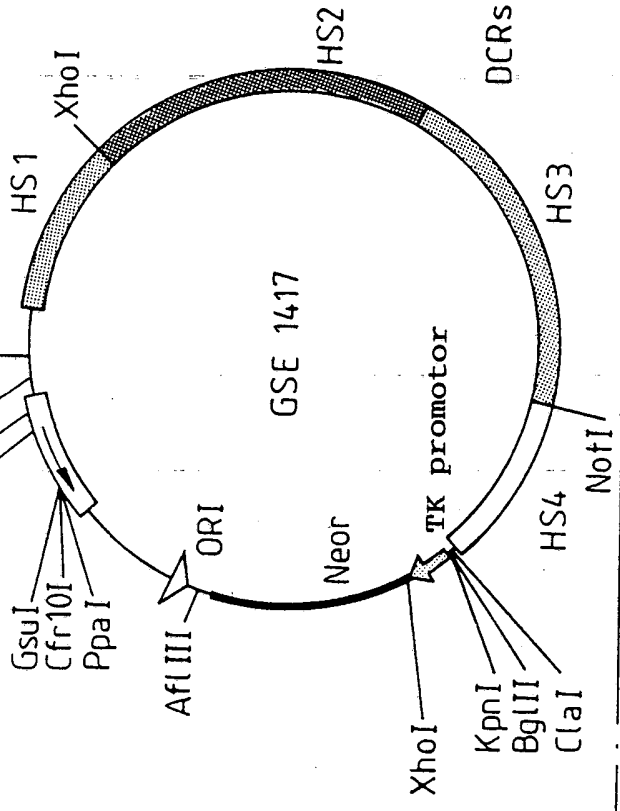
J. Kubař



Klonování fragmentu
ClaI/KpnI do GSE
1417

Obr. 7 (POKRAČ. 1)

číslo
149164
28. VIII 92
Tuzelo
ÚŘAD
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
ČRIL

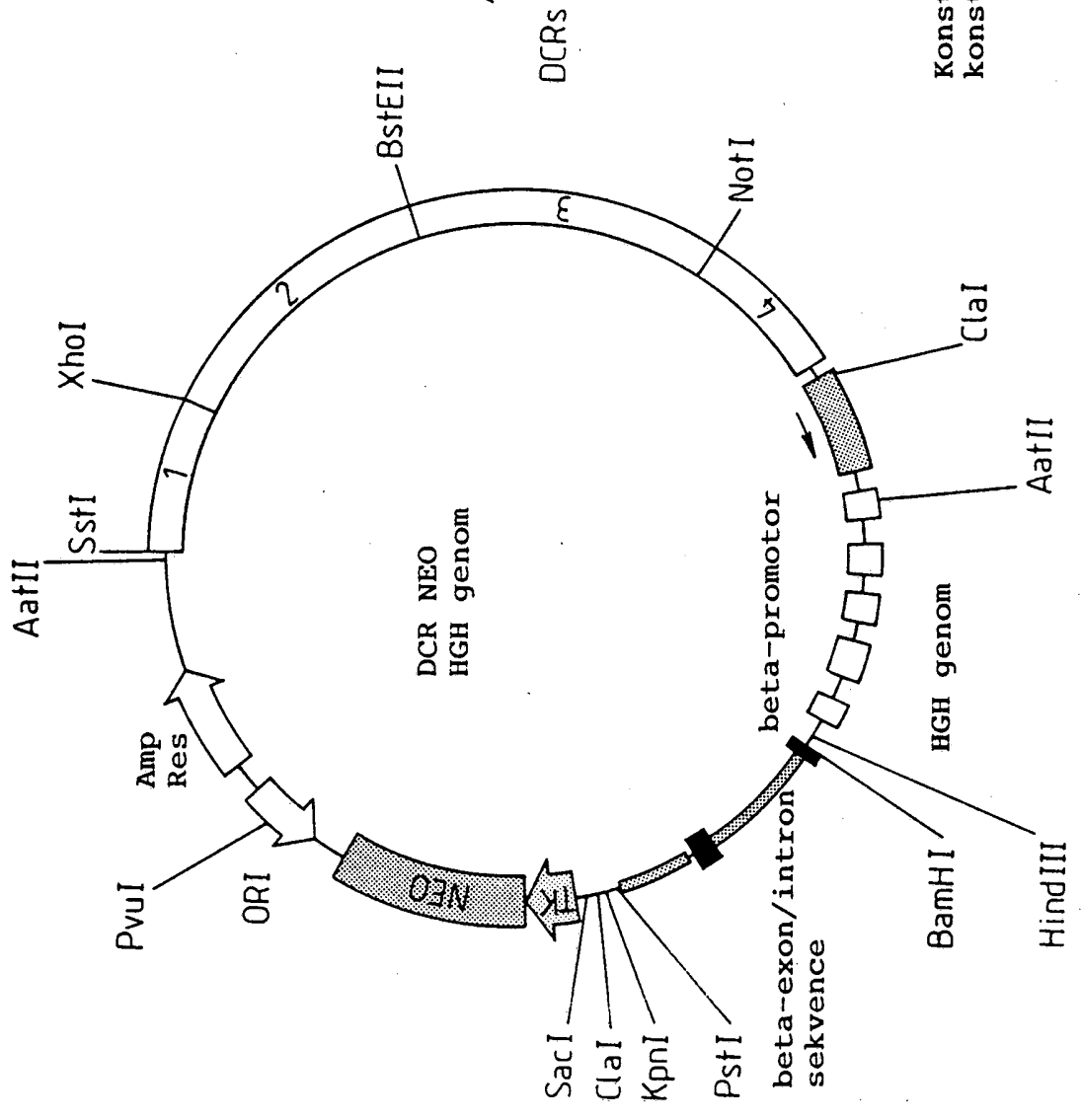


J. Čech
MUDr., Jm

0 4 9 1 6 4
 2 8 . V I I I 9 2
 URAD
 PRO VYMALEZY
 A OBJEVY
 28. VIII 92

Obr. 7 (POKRAČ 2)

ŠTĚPENÍ GSE
 1417 pomocí
 ClaI/KpnI



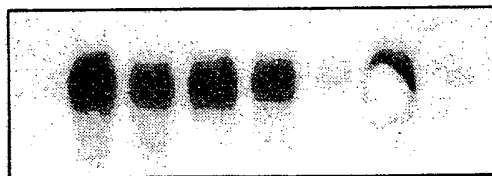
Konstrukce HGH genomového expresního konstruktů

J. Kubík

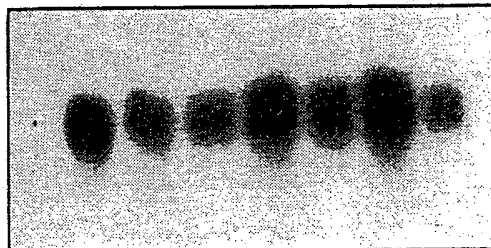
Č.j. 049464
DOSTA
28. VIII 92
URAD
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
PRIL.

Obr. 8

A B C D E F G

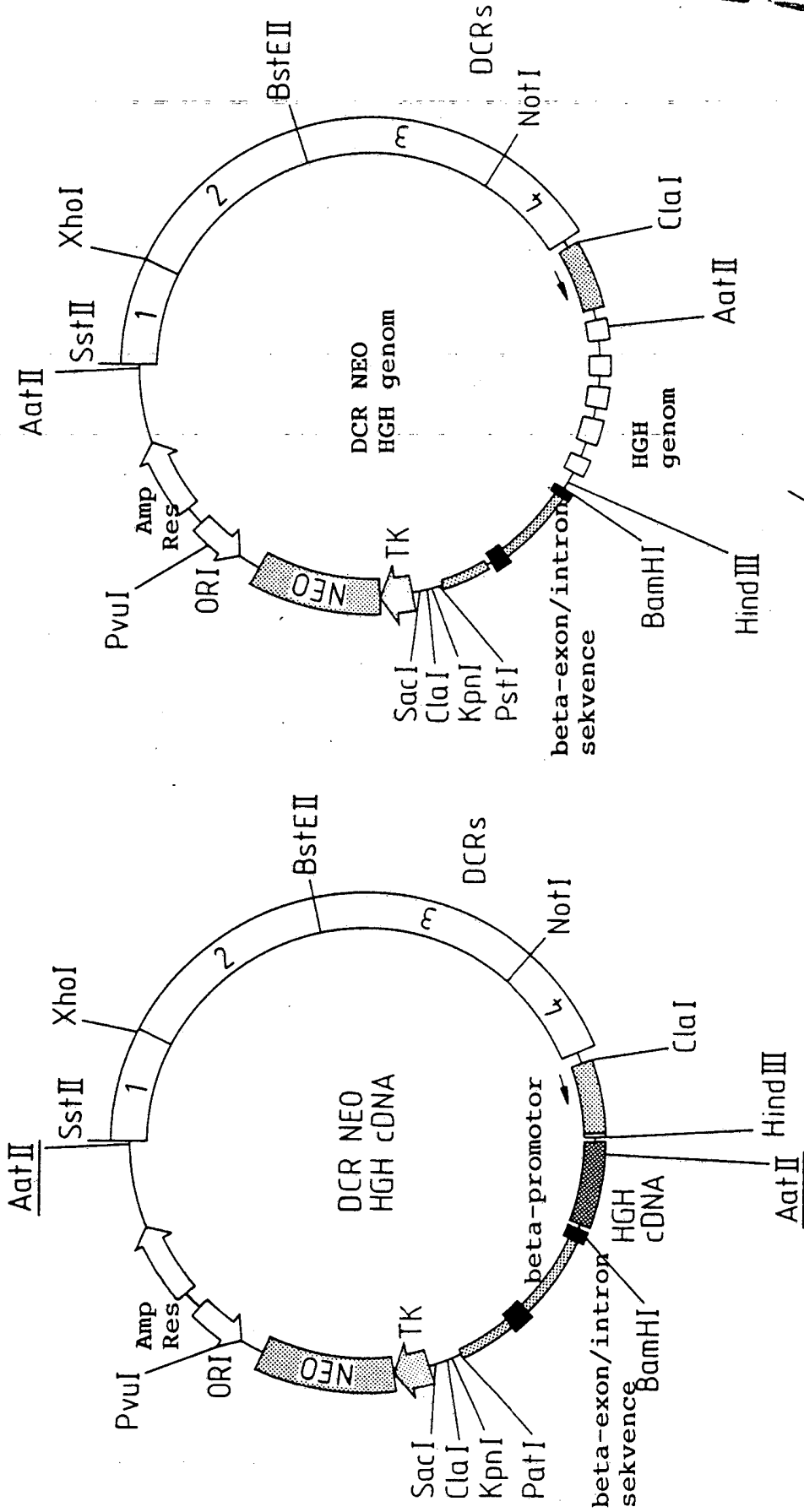


(i)

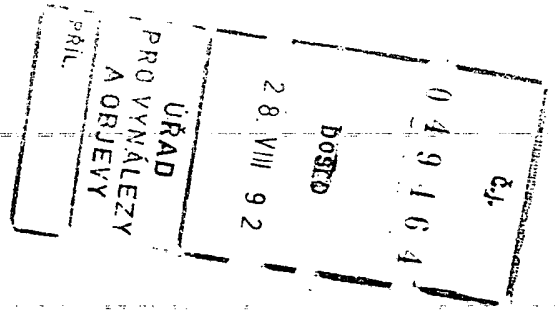


(ii)

Obr. 9.

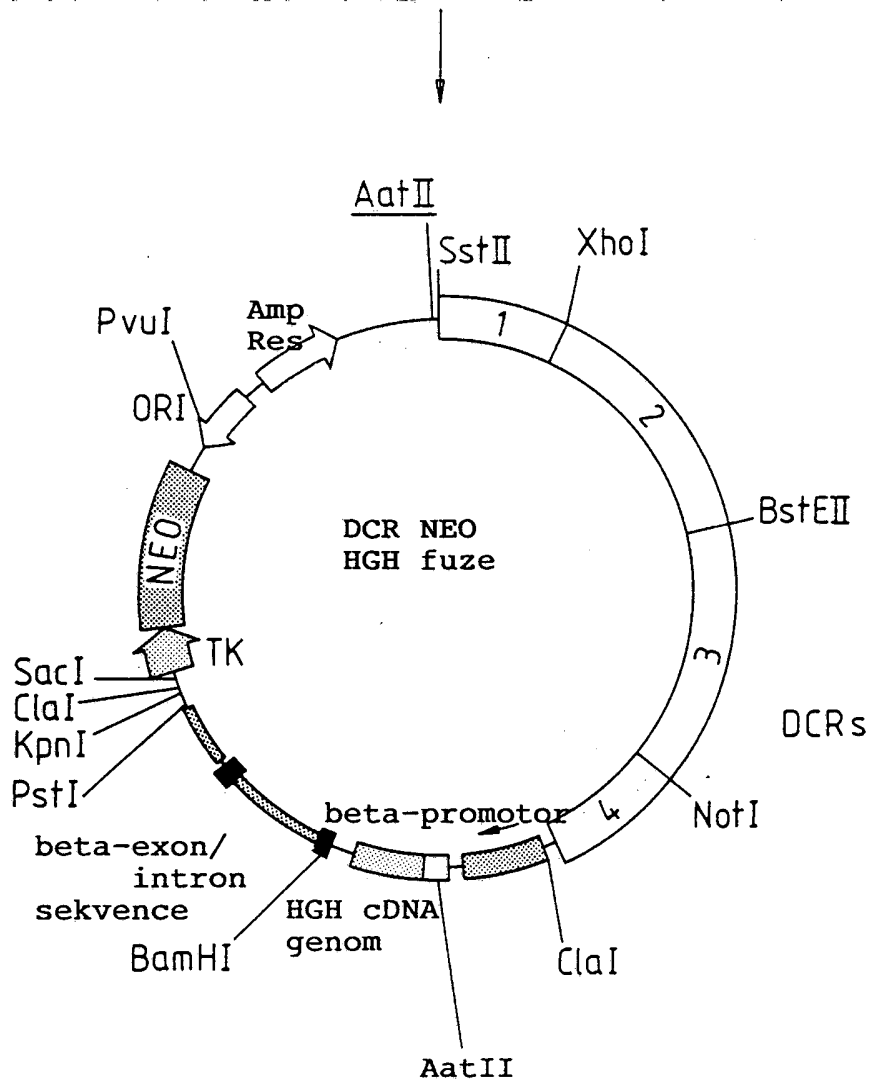


8. 49164
 8. VIII 92
 DOKTOR
 URAD
 VYVANYALEZY
 AOBJEVY



Obr. 9 (POKRAČ.)

Náhrada 7kb Aat II fragmentu z HGH
cDNA konstruktů fragmentem 7kb AatII z HGH
genomového konstruktů

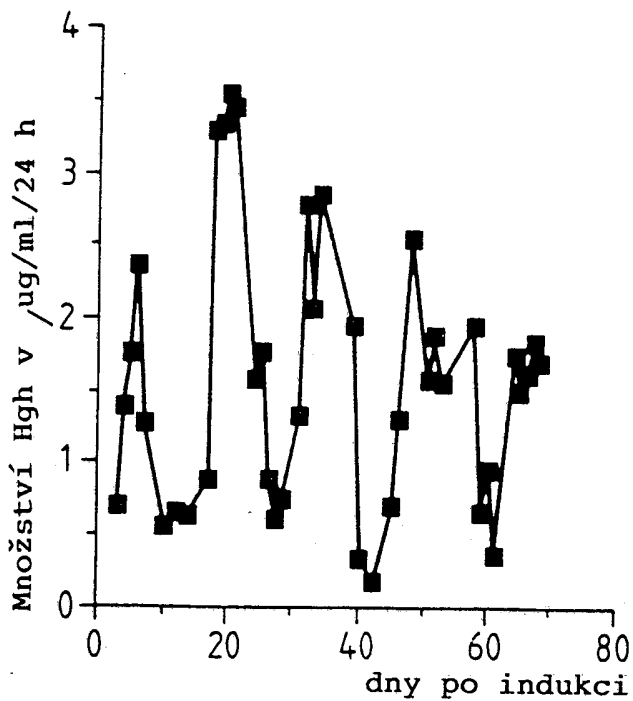
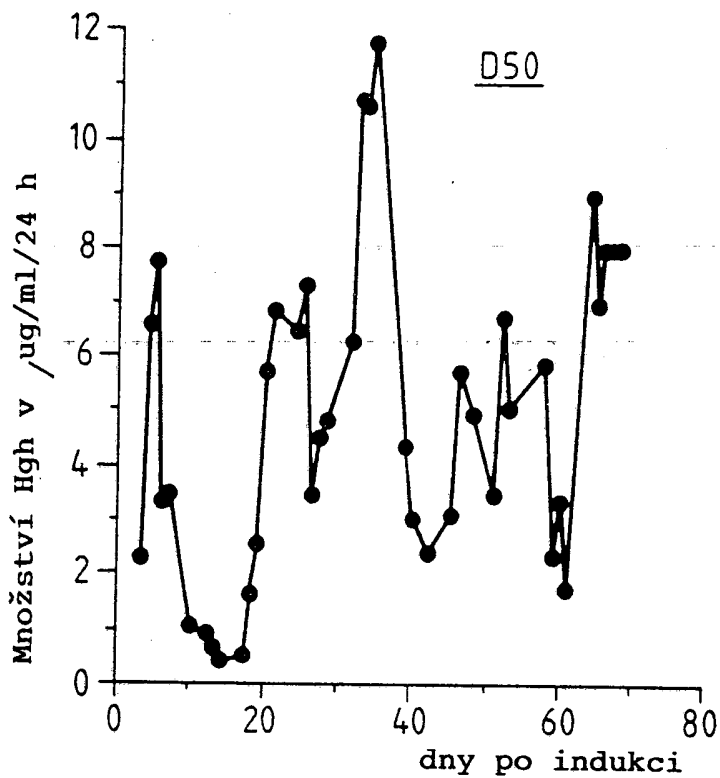


Konstrukce HGH cDNA genomového expresního konstruktů

J. Klus

PRIL.
 PRO VYMALEZY
 URAD
 28. VIII 92
 DOBRO
 049464
 31

Obr. 10.

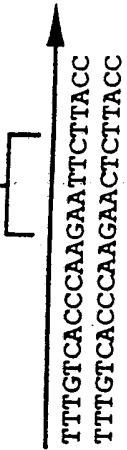


Dlouhodobá exprese a sekrece 2 HGH cDNA klonů v MELC88 buňkách

J. J. Cech

Obr. 11.

Eco RI

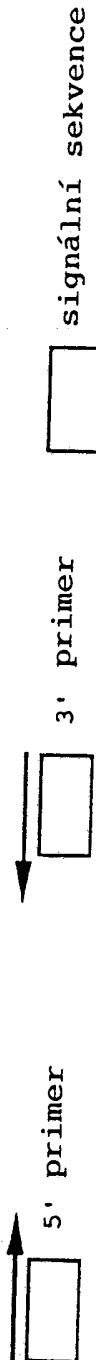


ATGAAGA
 ATGAAGACCCCTCTACTGTTGGCAGTGATCATGATCTTTGGCCTACTGCAGGCCCATGGG
 MetLysThrLeuLeuLeuAlaValIleMetIlePheGlyLeuLeuGlnAlaHisGly -
 AATTGGTGAATTTCCACAGAAATGATCAAGTTGACGACGAGAAAGAACGCCGCACTCAGT
 AsnLeuValAsnPheHisArgMetIleLysLeuThrThrGlyLysGluAlaLeuSer -
 TATGGCTTCTACGGCTGCCACTGTGGCGTGGGTGGCAGAGGATCCCCCAAGGATGCAACG
 TyrGlyPheTyrGlyCysHisCysGlyValGlyArgGlySerProLysAspAlaThr -
 GATCGCTGCTGTCACTCATGACTGTTGCTACAAACCGTCTGGAGAAACGTGGATGTGGC
 AspArgCysCysValThrHisAspCysCysTyrLysArgLeuGluLysArgGlyCysGly -
 ACCAAATTTCTGAGCTACAAGTTTAGCAACTCGGGAGCAGAATCACCTGTGCATAAACAG
 ThrLysPheLeuSerTyrLysPheSerAsnSerGlySerArgIleThrCysAlaLysGln -
 GACTCCTGCAGAAAGTCAACTGTGTGAGTGTGATAAGGCTGCTGCCACCTGTTTGTCTAGA
 AspSerCysArgSerGlnLeuCysGluCysAspLysAlaAlaAlaThrCysPheAlaArg -
 AACAAGACGACCTACAATAAAAAGTACCAGTACTCTCCAATAAACACTGCAGAGGGAGC
 AsnLysThrThrTyrAsnLysLysTyrGlnTyrTyrSerAsnLysHisCysArgGlySer -
 ACCCTCGTTGCTGAGTCCCCTCTTCCCCTGGAAACC
 ThrProArgCysEnd
 GCAACGACTCAGCTGAGAAGGGACCTTTGG

ACCCTCGTTGCTGAGTCCCCTCTTCCCCTGGAAACC
 ThrProArgCysEnd
 GCAACGACTCAGCTGAGAAGGGACCTTTGG



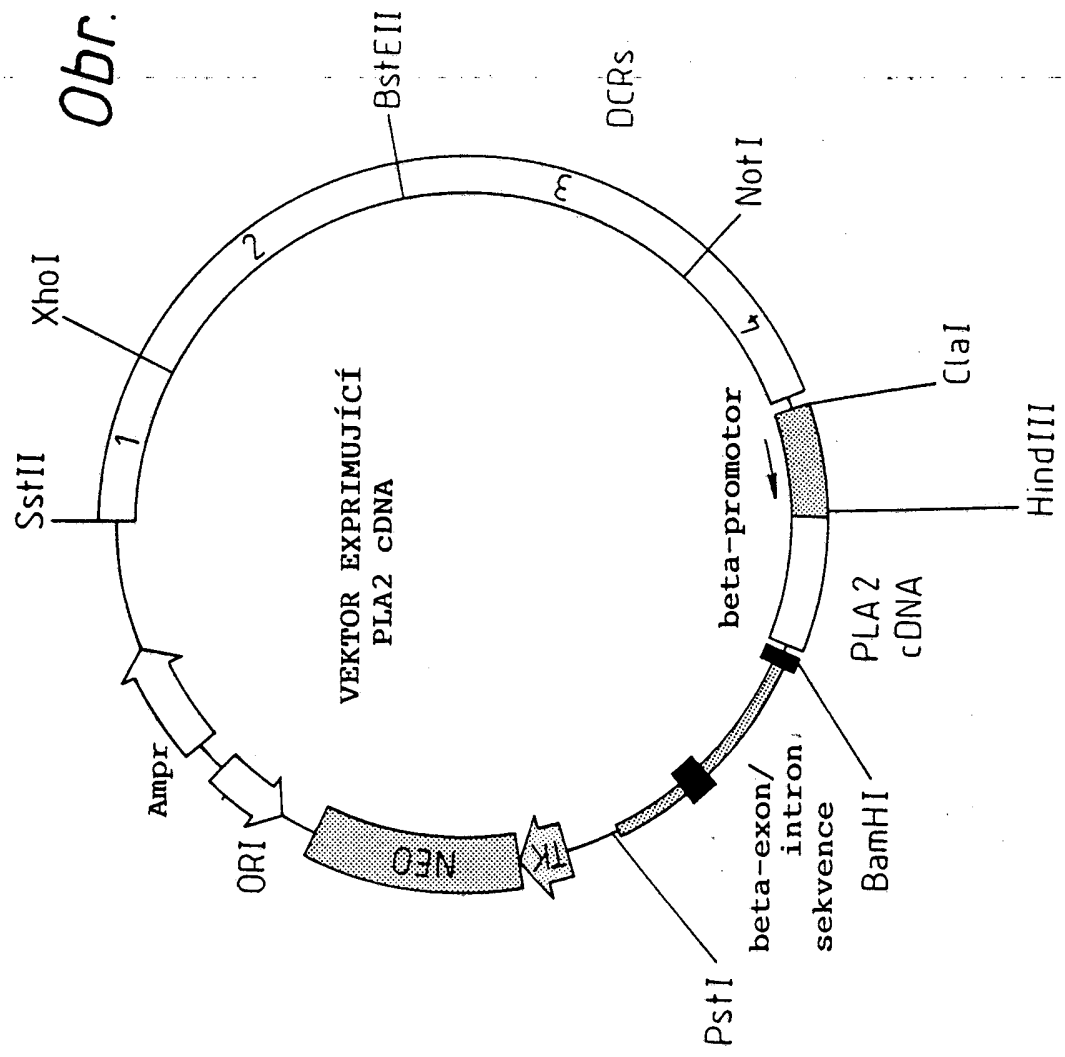
Sal I



URAD
 PRO VYNALEZY
 A OBJEVY
 28. VIII 92
 DOŠEL
 049464
 81

i. l. bub 5

Obr. 11 (POKRAČ.)

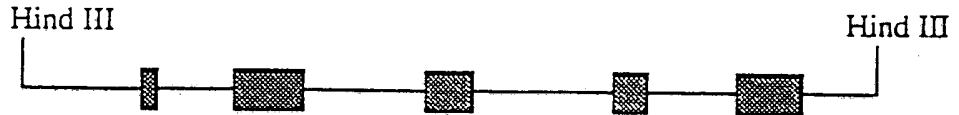


PRIL
PRO VYNALEZY
URAD
A OBJEVY
28. VIII. 92
BOBKO
049164
F2

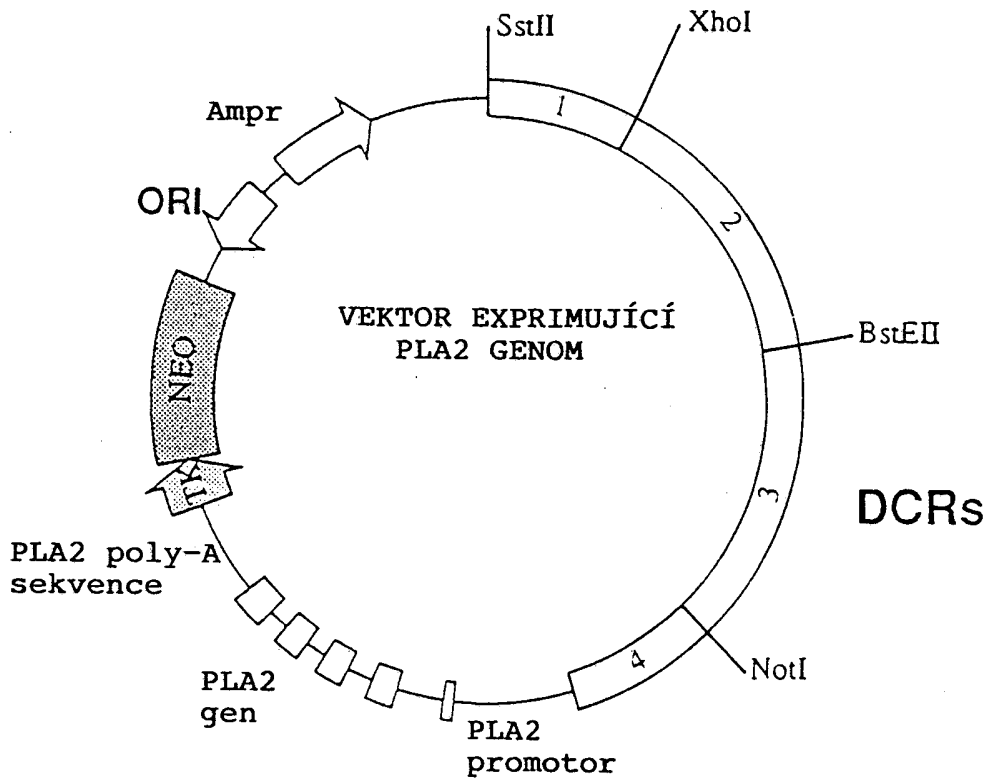
J. V. ČIHÁK

049164
 28. VIII 92
 DOSTA
 URAD
 PRO VYNALEZY
 A OBJEVY
 PRIL.

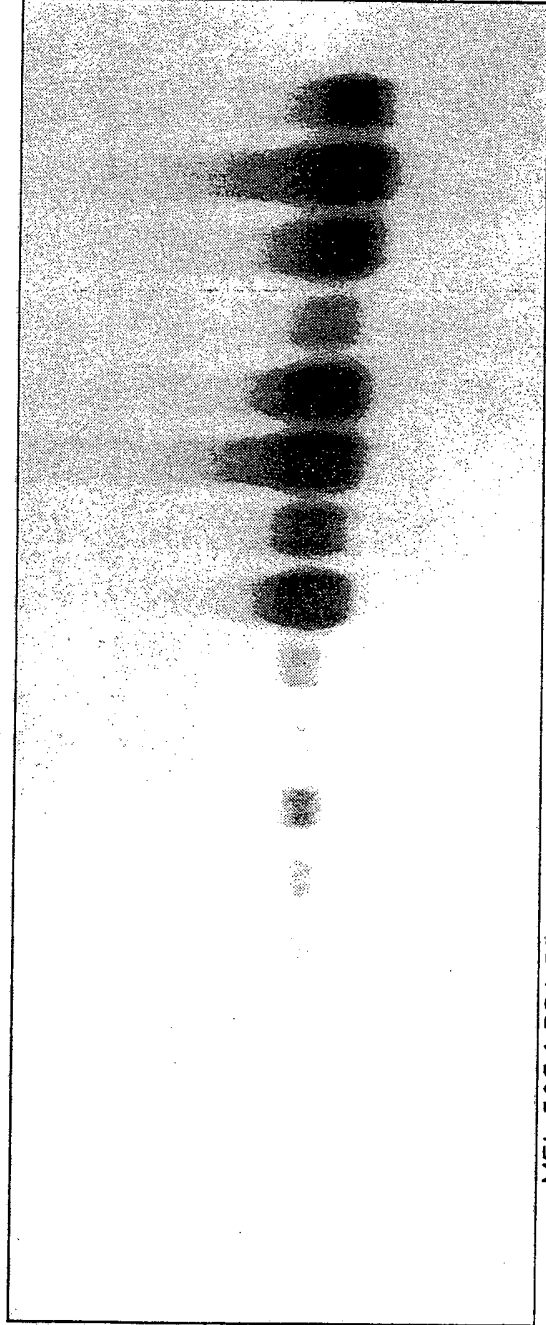
Obr. 12.



Fragment 6,2 kb Hind III kodující úplný PLA2 gen klonovaný do DCR expresního vektoru



Obr. 13B.



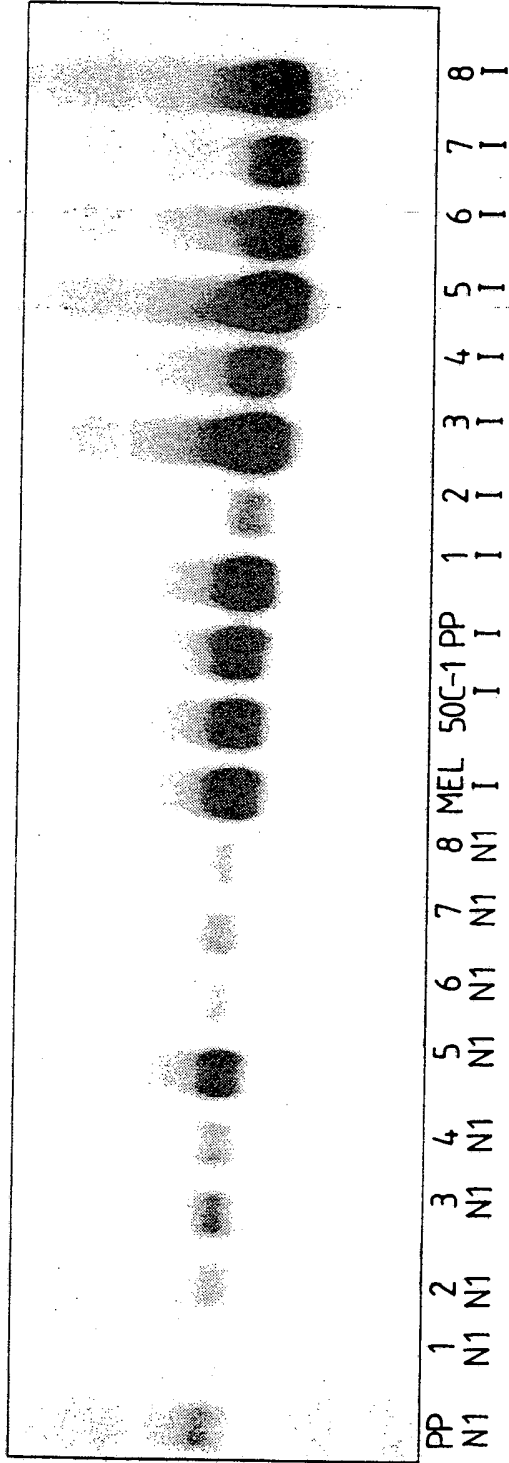
MEL 50C-1 PP1 PP2 1 2 3 4 MEL 50C-1 PP1 PP2 1 2 3 4
N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1 N1

URAD
PRO VYNNALEZY
A OBJEVY
KIL

049464
DOSTO
28. VIII 92

J. S. Kuli

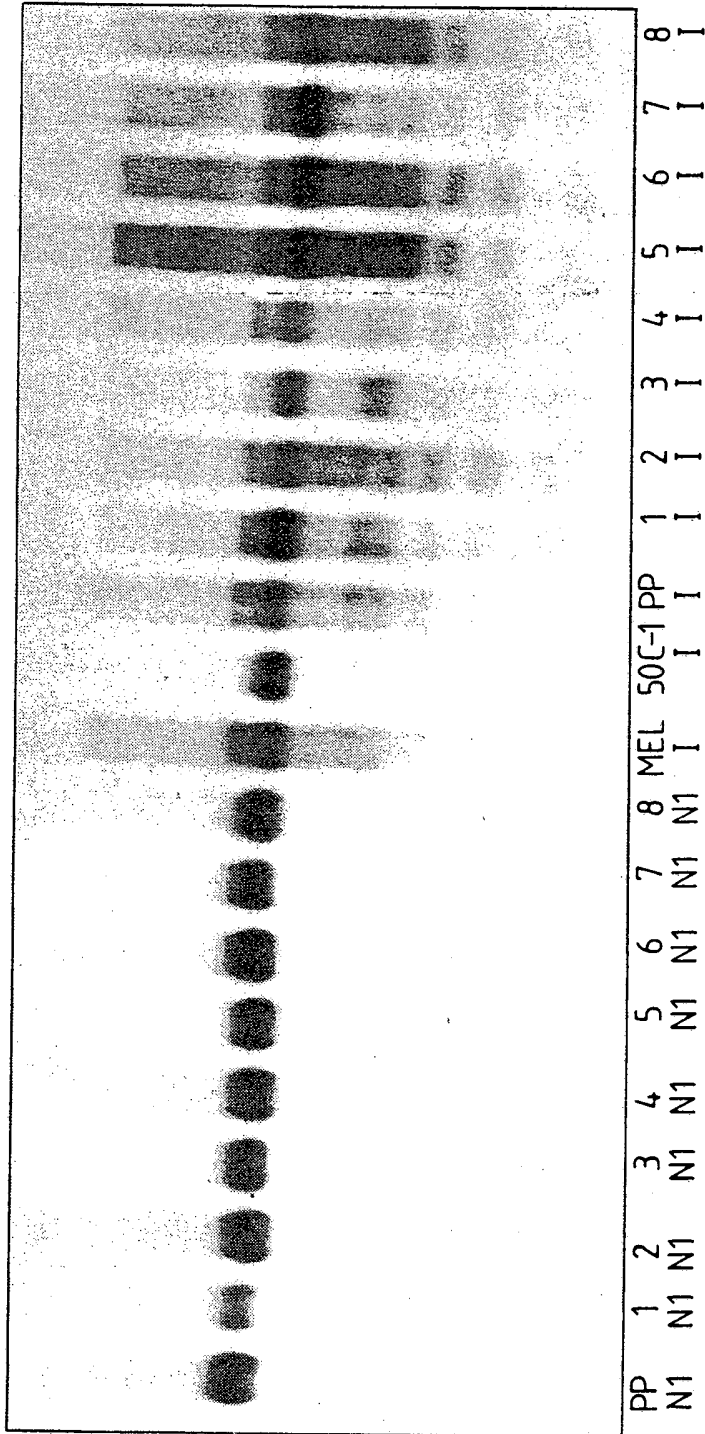
Obr. 14B.



049464
DOSTA
28. VIII 92
URAD
PROVINALEZY
AOBJEVY
PNL

JUDr. Jarmil
1.1. Kubit

Obr. 14C.

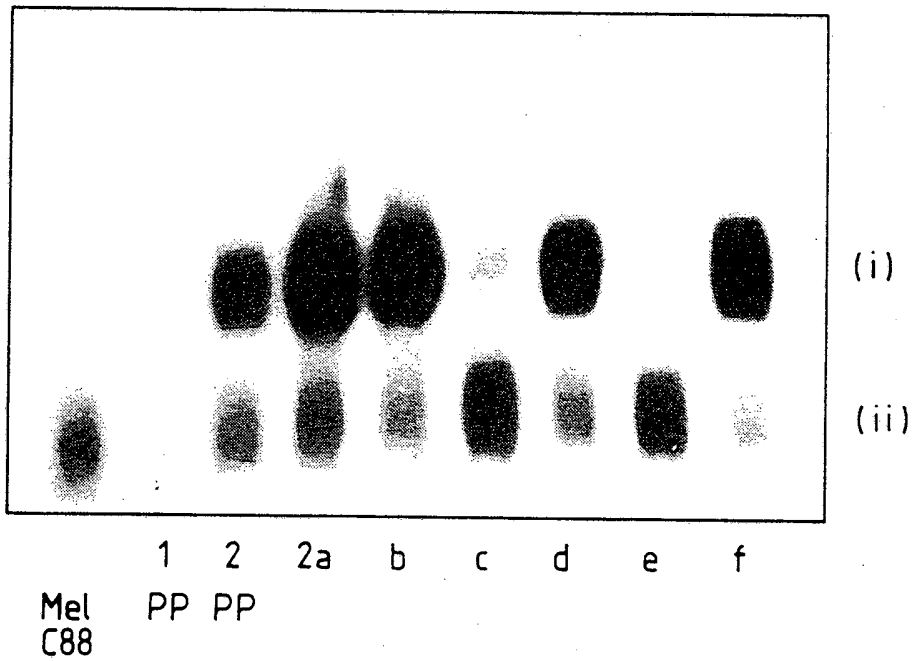


PNIL
URAD
PROVYNALEZY
A OBJEVY
28. VIII 92
DOSTA
049164
Kp.

JUDr. Jarmila Traplova
J. A. Kuchta

049464
 28. VIII 92
 DOŠTO
 ÚŘAD
 PRO VYNALEZY
 A OBJEVY
 PRILE

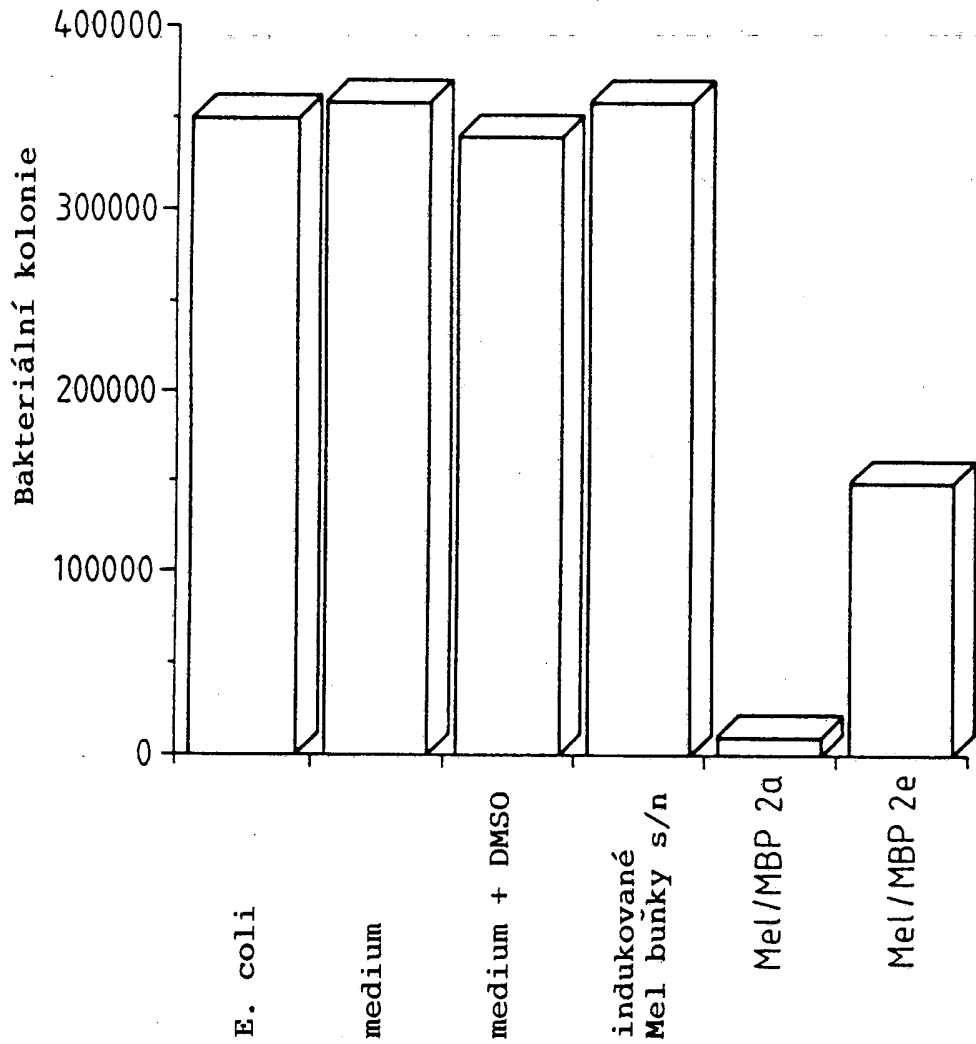
Obr. 15



I. P. Kubiš
 BUDr. Jarmila Tlustá

Čj.
049164
DOSTO
28. VIII 92
ÚŘAD
PRO VYHÁLEZY
A OBJEVY
SKL.

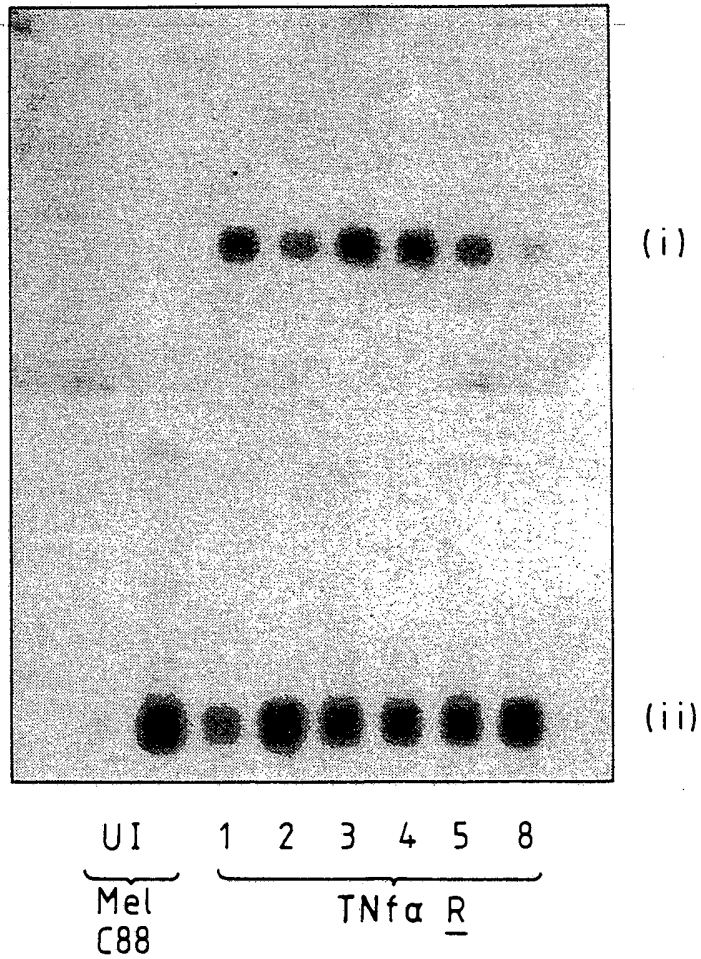
Obr. 16.



11. Kulš
JUDr. Jarmila Traplová

049164
DOSTA
28. VIII 92
URAD
PRO VYNALEZY
A OBJEVY
PRIL

Obr. 17.



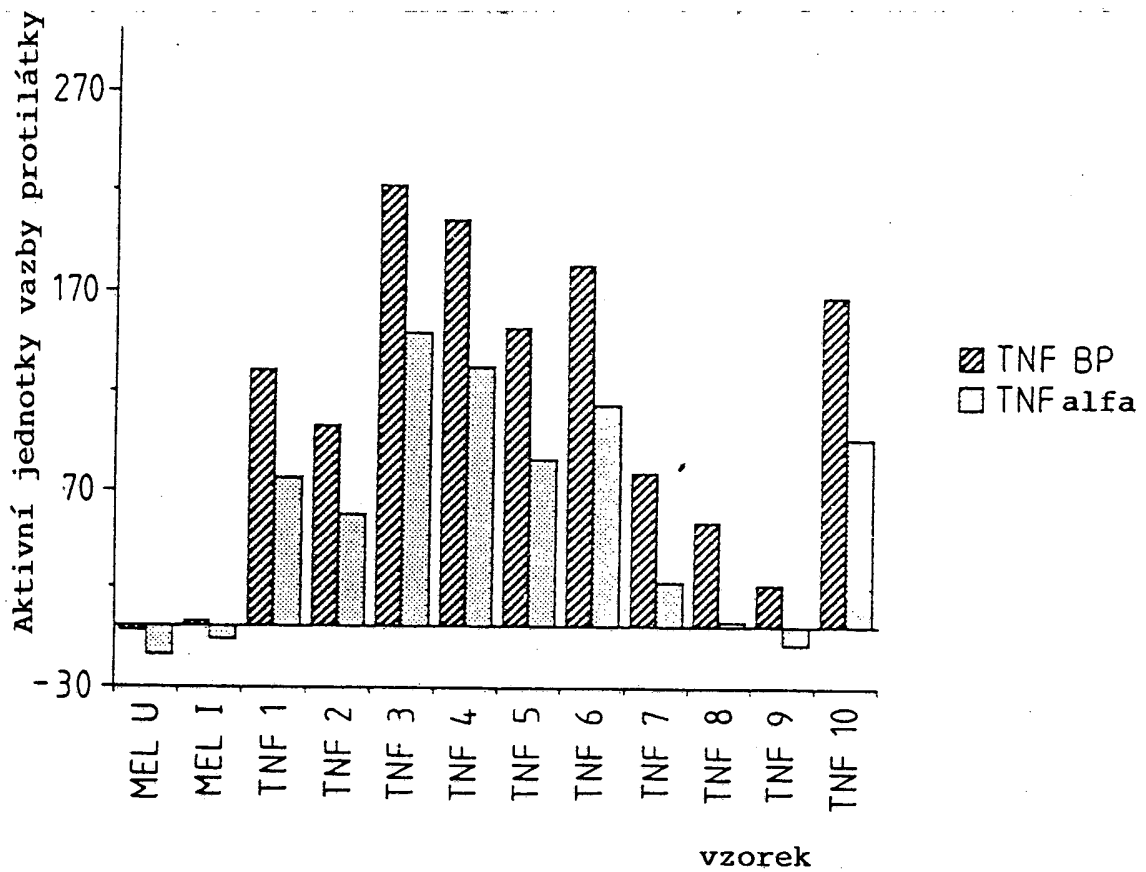
JUDr. Jarmila Traplova

Úřad
 PRO VYHÁLEŽY
 A OBJEVY
 PŘIL.

049164
 28. VIII. 92
 BOSTO

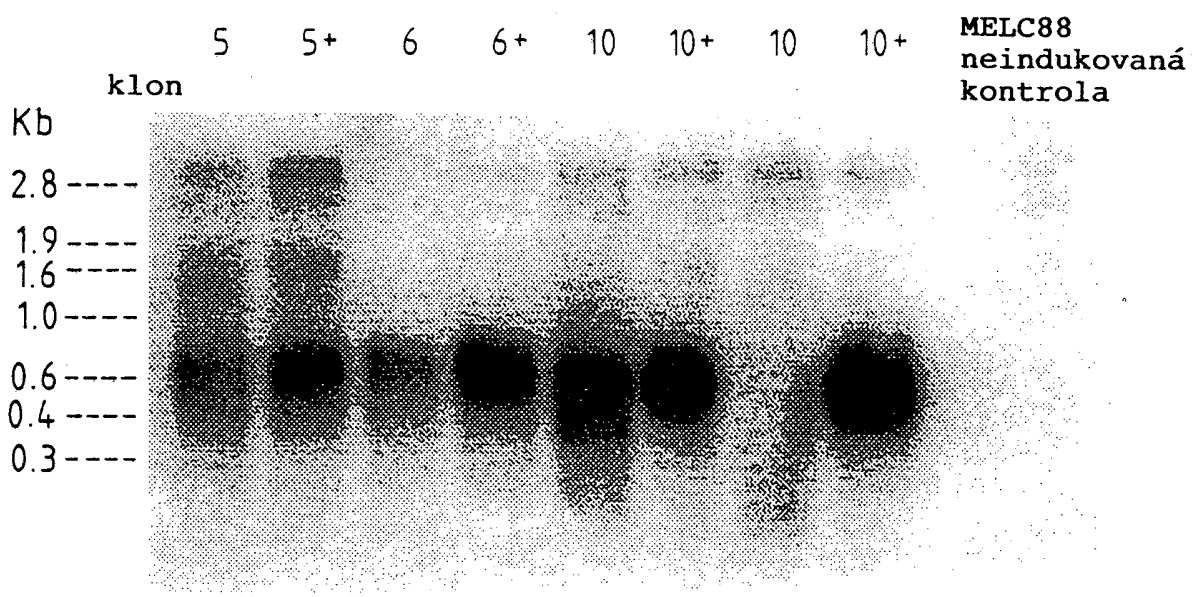
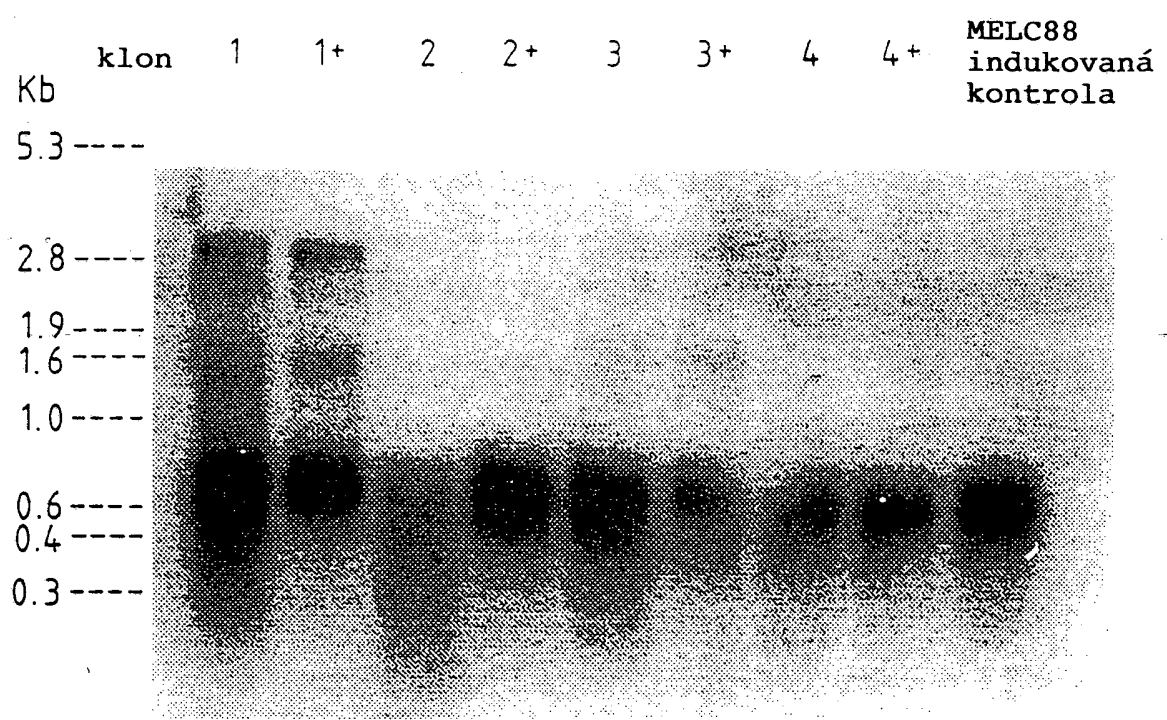
Čj.

Obr. 18.



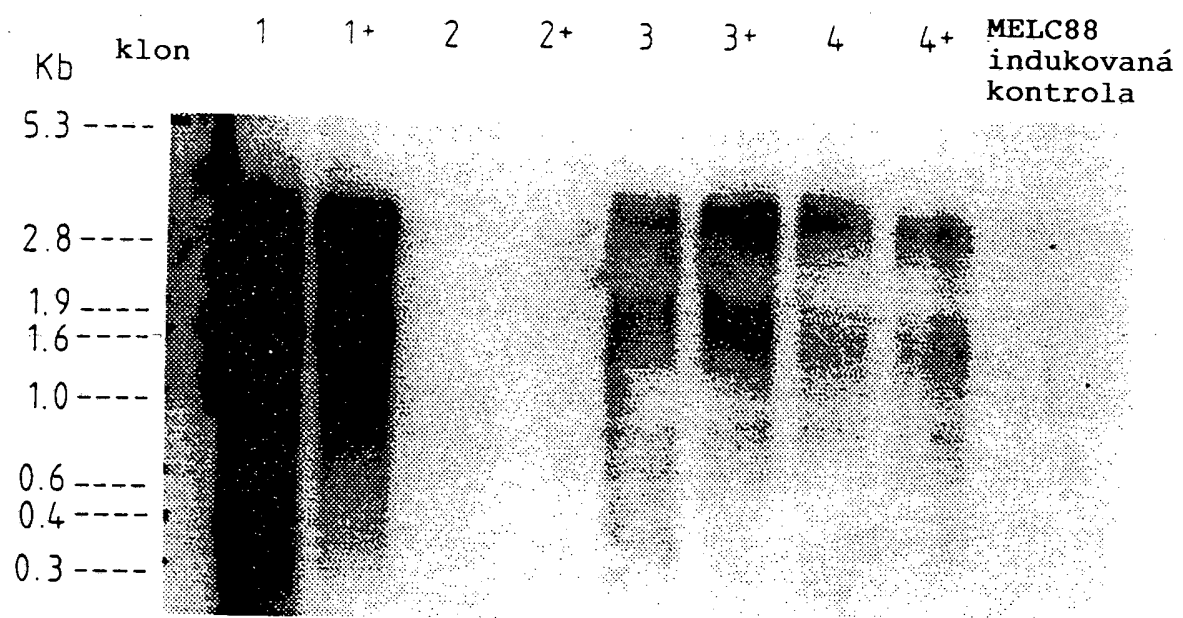
ÚŘAD
 PRŮVĚRNÁLEHY
 A OBJEVY
 0. VIII 92
 049164
 č.j.

Obr. 19.

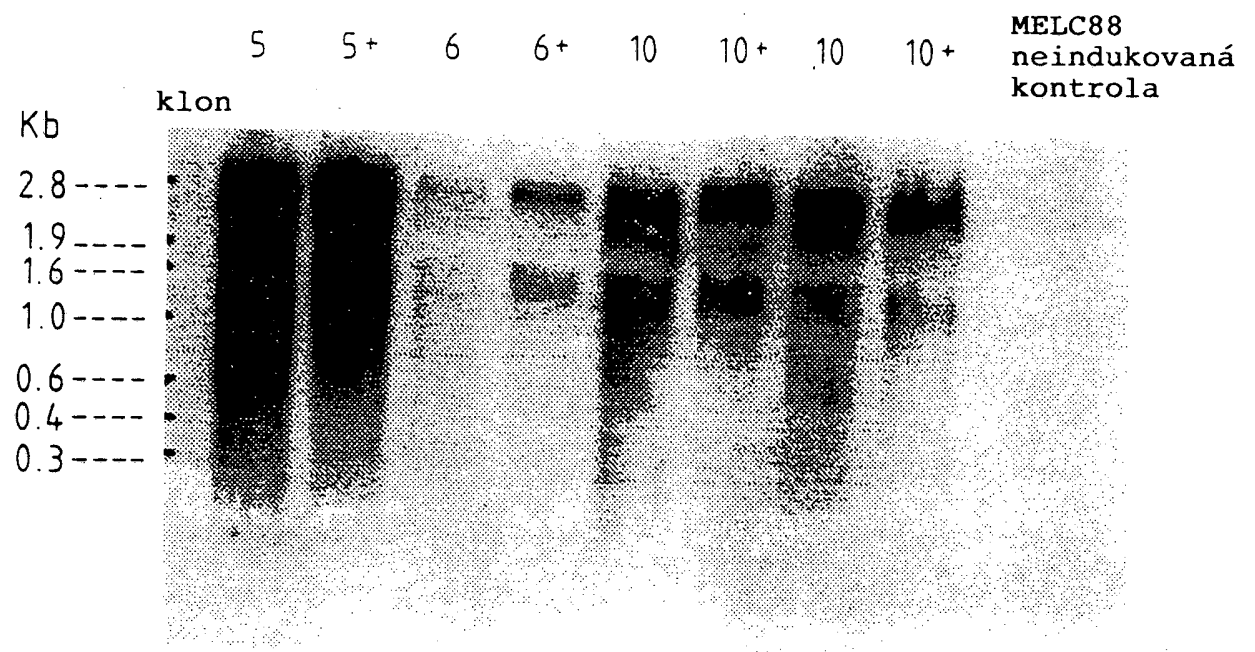


049164
 28. VIII 92
 DOŠED
 ÚRAD
 PRO VYHĀLEZY
 A OBJEVY
 PRIL

Obr. 20.



4 hod. expozice

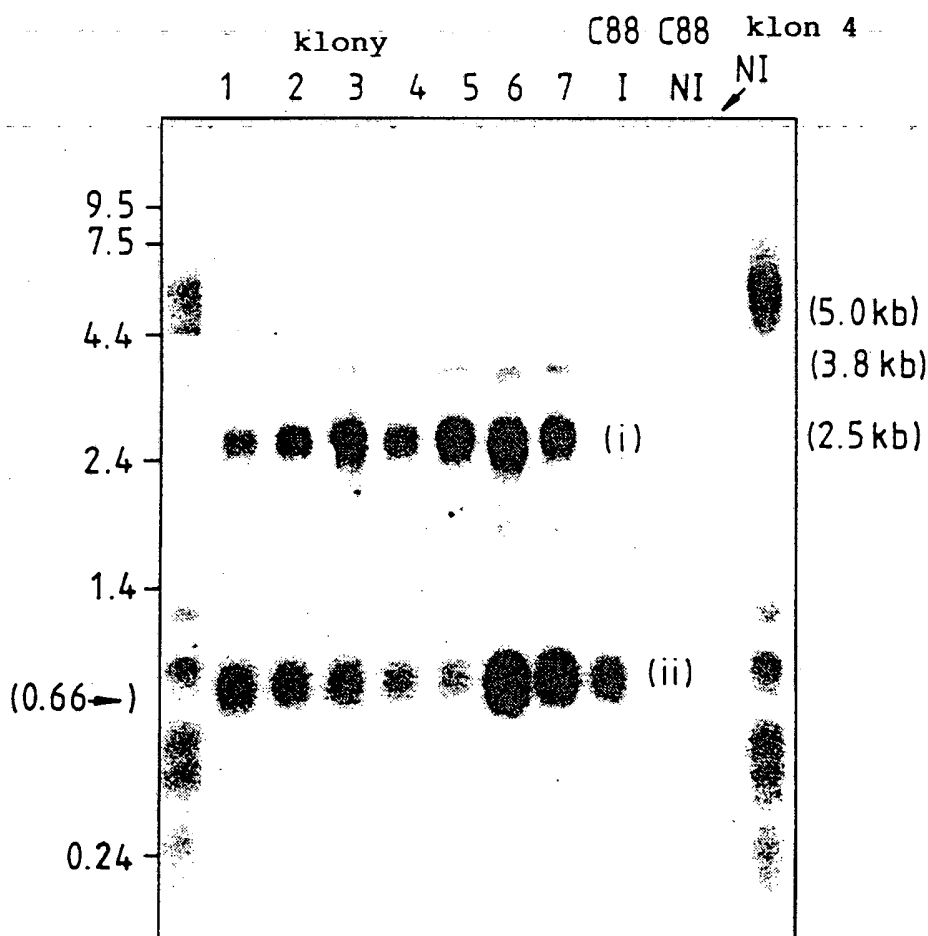


4 hod. expozice

J. Kubík

č.j. 049464
 DOŠLO 28. VIII 92
 ÚŘAD
 PRO VYHÁLEZY
 A OBJEVY
 PRIL.

Obr. 21.

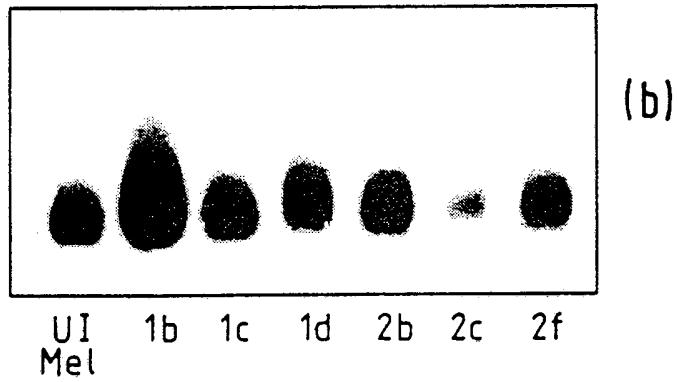
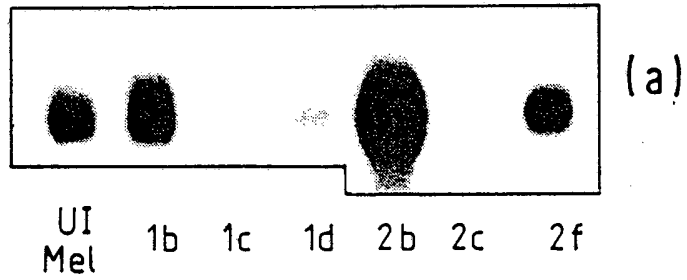


PRIL.
URAD
PROVYNALEZY
A OBJEVY

049464
28. VIII 92
DOSTO

81.

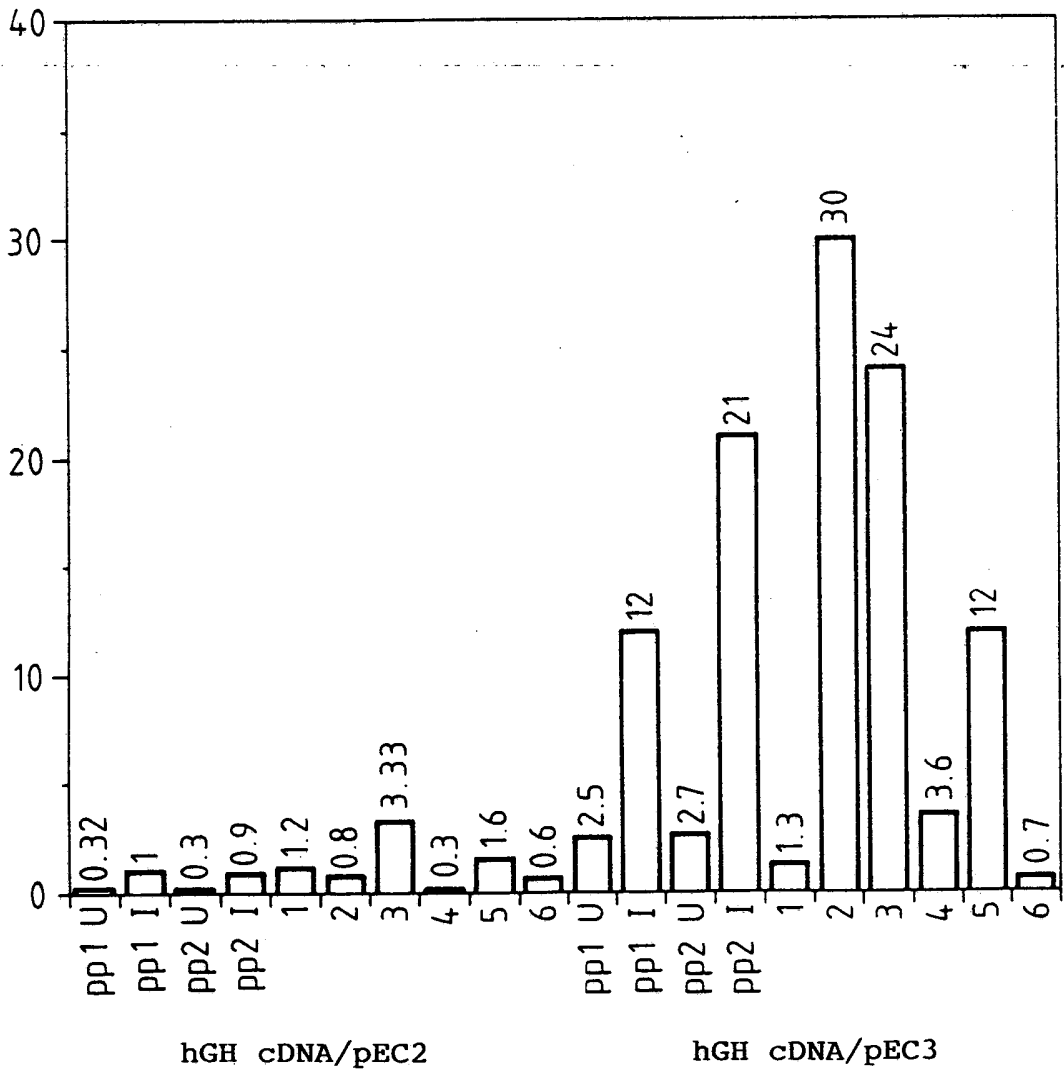
Obr. 22.



049164
 DOSTA
 28. VIII 92
 ÚŘAD
 PRO VYNALEZY
 A OBJEVY
 PRIL.

Obr. 23.

Hgh aktivita v μ l/ml (4 dny po indukci)



JUDr. Jarmila Trapl
 J. I. Čulík