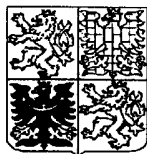


# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 287 620

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1999 - 4314

(22) Přihlášeno: 03.12.1985

(30) Právo přednosti:

22.01.1985 US 1985/693258

03.01.1985 US 1985/688622

04.12.1984 US 1984/677813

(40) Zveřejněno: 16.02.2000

(Věstník č. 2/2000)

(47) Uděleno: 03.11.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.01.2001

(Věstník č. 1/2001)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

C 12 P 21/02

C 12 N 15/10

C 07 K 14/00

//(A 61 K 35/12)

(73) Majitel patentu:

GENETICS INSTITUTE, INC., Cambridge, MA,  
US;

(72) Původce vynálezu:

Fritsch Edward, Concord, MA, US;  
Hewick Rodney M., Lexington, MA, US;  
Jacobs Kenneth, Newton, MA, US;  
Kaufman Randal J., Boston, MA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob produkce lidského erythropoietinu**

(57) Anotace:

Způsob produkce lidského erythropoietinu, při němž se ve vhodném médiu kultivují eukaryontní hostitelské buňky, obsahující DNA sekvenci, znázorněnou v tabulce 3 od sekvence ATG kódující počáteční Met do AGA kódující terminální Arg, operativně připojenou k expresní kontrolní sekvenci, a takto vyrobený erythropoietin se oddělí od buněk a média.

CZ 287620 B6

## Způsob produkce lidského erythropoietinu

### Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu produkce lidského erythropoietinu.

### Dosavadní stav techniky

10

Erythropoietin (dále označován jako EPO) je cirkulující glykoprotein, který stimuluje tvorbu erythrocytů ve vyšších organismech, viz Carnot a spol., Compt. Rend., 143:384 (1906). Jako takový je EPO někdy označován jako erythrocyty stimulující faktor.

15

Doba životnosti lidských erythrocytů je asi 120 dnů. Asi 1/120 celkových erythrocytů je denně odbourána v retikulo-endotheliálním systému. Současně je denně produkován relativně konstantní počet erythrocytů, aby byla stále udržena určitá hladina erythrocytů (Guyton, Textbook of Medical Physiology, str. 56 až 60, W. B. Saunders Co., Philadelphia 1976).

20

Erythrocyty jsou produkovány zráním a diferenciací erythroblastů v kostní dřeni a EPO je faktor, který působí na méně diferencované buňky a indukuje jejich diferenciaci k erythrocytům (viz výše).

25

EPO je slibným terapeutickým prostředkem pro klinickou léčbu anémie nebo konkrétně renální anémie. V praktické terapii není používání EPO dosud bohužel běžné pro jeho malou dostupnost.

30

Pro použití EPO jako terapeutického prostředku je třeba uvážit možné problémy antigenicity a proto je výhodné připravovat EPO ze suroviny lidského původu. Je možno například použít lidskou krev nebo moč pacientů, postižených aplastickou anémií nebo podobnými nemocemi, které způsobují vylučování velkého množství EPO. Tyto suroviny však jsou k dispozici v omezeném množství, viz například White a spol., Rec. Progr. Horm. Res., 16; 219 (1960), Espada a spol., Biochem. Med., 3; 475 (1970), Fisher, Pharmacol. Rev., 459 (1972) a Gordon, Vitam. Horm. (N. Y.) 31; 105 (1973).

35

Příprava EPO produktů se obvykle prováděla koncentrací a čištěním moči pacientů, vykazujících vysokou úroveň EPO, například pacientů, postižených aplastickou anémií a podobnými nemocemi, viz například patenty USA 4397840, 4303650 a 3865801. Omezená zásoba takovéto moči je překážkou praktického použití EPO, a tudíž je velmi žádoucí připravovat EPO produkty z moči zdravých osob. Problém použití moči zdravých lidí spočívá v jejím nízkém obsahu EPO ve srovnání s anemickými pacienty. Moč zdravých jedinců obsahuje určité inhibiční faktory, které v dostatečně vysoké koncentraci působí proti erythropoese, takže dostatečný terapeutický účinek může být u EPO, získaného z takové moči, dosažen pouze s použitím následujícího významného postupu čištění.

45

EPO lze rovněž regenerovat z ovčí krevní plazmy a separace EPO z této krevní plazmy poskytla dostatečně potentní a stabilní vodorozpustné preparáty, viz Goldwasser, Control Cellular Dif. Develop., díl A, str. 487 až 494, Alan R. Liss, Inc., N. Y. (1981). Lze však očekávat, že ovčí EPO bude pro lidi antigenní.

50

Běžné izolační a čistící metody s použitím přírodních zdrojů EPO tedy nejsou adekvátní masové produkci tohoto žádaného terapeutického prostředku.

55

Sugimoto a spol. v patentu USA 4377513 popisují jeden ze způsobů masové produkce EPO, zahrnující multiplikace in vivo lidských lymfoblastoidních buněk, zahrnujících Namalwa, BALL-1, NALL-1, TALL-1 a JBL.

Zprávy o produkci EPO jinými metodami genetického inženýrství se objevily ve standardní literatuře. Nebyl však zatím publikován reprodukovatelný způsob výroby ani chemická charakteristika produktu. Předmět tohoto vynálezu naproti tomu představuje reprodukovatelný způsob masové produkce proteinů, vykazujících biologické vlastnosti lidského EPO. Tímto způsobem je možno rovněž produkovat proteiny, které se mohou chemicky lišit od autentického lidského EPO a současně vykazovat podobné (a v některých případech zlepšené) vlastnosti. Pro jednoduchost jsou zde všechny proteiny, vykazující biologické vlastnosti lidského EPO, označovány jako EPO bez ohledu na to, zda s ním jsou nebo nejsou chemicky identické.

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob produkce lidského erythropoietinu, jehož podstata spočívá v tom, že se ve vhodném médiu kultivují eukaryotní hostitelské buňky, obsahující DNA sekvenci, znázorněnou v tabulce 3, od sekvence ATG kódující počáteční Met od AGA kódující terminální Arg, operativně připojenou k expresní kontrolní sekvenci, a takto vyrobený erythropoietin se oddělí od buněk a média.

Ve výhodném provedení obsahuje kultivační médium fetální sérum. Jako hostitelské buňky přicházejí v úvahu zvláště savčí buňky, s výhodou buňky COS, CHO, C127 nebo 3T3 a nejlépe buňky 3T3 nebo buňky vaječníků čínské křečka (CHO).

Ve zvláště výhodném provedení způsobu podle vynálezu je DNA sekvence obsažena ve vektoru, který také obsahuje DNA hovězího papilomaviru.

Předložený vynález se tedy týká exprese DNA, která exprimuje překvapivě vysoké hladiny lidského EPO, jeho exprese a masové produkce aktivního lidského EPO in vitro. Jsou také popsány vhodné expresní vektory pro produkci EPO, expresní buňky, schémata čištění a příbuzné procesy.

Jak je podrobněji dále popsáno, byl EPO získán v částečně čištěné formě a byl dále čištěn do homogenity a štěpen trypsinem za vzniku specifických fragmentů. Tyto fragmenty byly čištěny a sekvenovány. EPO oligonukleotidy byly navrženy a syntetizovány na základě těchto sekvencí. Tyto oligo byly použity ke screeningu lidské genomické knihovny, ze které byl izolován EPO gen.

EPO gen byl ověřen na základě své DNA sekvence, která odpovídala mnoha ze sekvenovaných tryptických proteinových fragmentů. Část genomického klonu pak byla použita pro demonstraci při hybridizaci, že EPO mRNA by mohla být detekována v lidské fetální mRNA (stáří 20 týdnů). Byla připravena cDNA knihovna jater lidského plodu a byla screenována. Byly získány tři EPO cDNA klony (po screeningu 750 000, rekombinantů). Dva z těchto klonů byly stanoveny jako mající plnou délku podle kompletní kódující sekvence a v podstatě 5-konec a 3-konec netranslatované sekvence. Tyto cDNA byly exprimovány jak v SV-40 virem transformovaných opičích buňkách (COS-1 buněčná linie; Gluzman, Cell 23:175-182 (1981)) a buňkách vaječníků čínských křeček (buněčná linie CHO; Urlaub G. a Chasin L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4280 (1980)). EPO produkovaný z COS buňky je biologicky aktivní EPO in vitro a in vivo. EPO produkovaný z CHO buněk je také biologicky aktivní in vitro a in vivo.

EPO cDNA klon má zajímavý otevřený čtecí rámeček 14-15 aminokyselin (aminoacids -aa) s iniciátorem a terminátorem ze 20 až 30 nukleotidů (nt) proti směru kódující oblasti. Reprezentativní vzorek E.coli, transfektované klonovaným EPO genem, byl uložen v American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, který je dostupný pod přírůstkovým číslem ATCC 40153.

Popis obrázků na připojených výkresech

Tabulka 1 je sekvence 87 párů bází exonu lidského EPO genu;

5

obr. 1 ilustruje detekci EPO mRNA v lidské fetální jaterní mRNA,

tabulka 2 ilustruje aminokyselinovou sekvenci EPO proteinu, odvozenou z nukleotidové sekvence lambda-HEPOFL13;

10

tabulka 3 ilustruje nukleotidovou sekvenci EPO cDNA v lambda-HEPOFL13 (uvedena schematicky na obr. 2) a z ní odvozenou aminokyselinovou sekvenci;

obr. 3 ilustruje relativní polohy DNA inzertů čtyř nezávislých lidských EPO genomických klonů;

15

obr. 4 představuje mapu zjevné intronové a exonové struktury lidského EPO genu;

tabulka 4 ilustruje DNA sekvenci EPO genu;

20

obr. 5A, 5B a 5C ilustrují konstrukci vektoru 910(B);

obr. 6 ilustruje SDS polyakrylamidovou gelovou analýzu EPO, produkovaného v COS-1 buňkách, ve srovnání s nativním EPO,

25

tabulka 6 ilustruje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci EPO klonu, lambda-HEPOFL8;

tabulka 7 ilustruje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci EPO klonu, lambda-HEPOFL13;

obr. 7 je schematickou ilustrací plazmidu pRk1-4, a

30

obr. 8 je schematickou ilustrací plazmidu pdBPV-MMTneo(342-12).

Předložený vynález se tedy týká produkce lidského EPO in vitro expresí DNA, která byla popsána výše.

35

V patentové a vědecké literatuře je uváděno mnoho způsobů, vhodných pro produkci rekombinantních proteinů. Obecně tyto techniky zahrnují izolaci nebo syntézu požadované genové sekvence a expresi takové sekvence buď v prokaryotické nebo eukaryotické buňce za použití technik běžně odborníkům známých. Jakmile byl gen izolován, čištěn a inzertován do transfer vektoru (tj. klonován), je zajištěna dostupnost podstatného množství. Vektor s do něj klonovaným genem je transferován do vhodného mikroorganismu nebo buněčné linie, například bakterie, kvasinky, savčích buněk, jako jsou COS-1 buňky (opičí ledviny), CHO (vaječníky čínské křečka), hmyzí buněčné linie a podobně, kde se vektor replikuje při proliferaci mikroorganismu nebo buněčné linie a ze kterých vektor může být izolován běžnými prostředky. Je tak poskytnut obnovitelný zdroj genu pro další manipulace, modifikace a transfery do jiných vektorů nebo jiných míst v tomtéž vektoru.

45

Expese může být často dosažena transferováním klonovaného genu ve správné orientaci a čtecím rámečku do vhodného místa v transfer vektoru tak, že translační čtecí postup z prokaryotického nebo eukaryotického genu vede k syntéze proteinového prekurzoru, obsahujícího aminokyselinovou sekvenci, kódovanou klonovaným genem, připojeného k Met nebo aminokoncové sekvenci z prokaryotického nebo eukaryotického genu. V obou případech mohou být signály pro iniciaci transkripce a translace dodány vhodným genomickým fragmentem klonovaného genu. Mnoho specifických technik štěpení proteinů může být použito pro štěpení proteinového prekurzoru, je-li produkován, v požadovaném bodě tak, aby se uvolnila

50

55

požadovaná aminokyselinová sekvence, která může být pak čištěna obvyklými prostředky. V některých případech je protein, obsahující požadovanou aminokyselinovou sekvenci, produkován bez potřeby specifických technik štěpení a může být také uvolněn z buněk do extracelulárního růstového média.

5 Izolace genomického klonu lidského EPO

Lidský EPO byl čištěn do homogenity z moči pacientů, postižených aplastickou anémií, jak popsáno dále. Úplné štěpení tohoto čištěného EPO proteázovým trypsinem poskytlo fragmenty, které byly odděleny vysokotlakovou kapalinovou chromatografií s reverzní fází, získány z gradientových frakcí a podrobeny mikrosekvenční analýze. Sekvence tryptických fragmentů jsou podtrženy v tabulkách 2 a 3 a jsou podrobněji diskutovány dále. Dvě aminokyselinové sekvence, Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys a Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg, byly zvoleny pro návrh oligonukleotidových sond (vedoucích k oligonukleotidovému poolu 17 nt dlouhému a 32-krát degenerovanému, a oligonukleotidovému poolu 18 nt dlouhému a 128-krát degenerovanému, ze dřívějšího tryptického fragmentu jakož i dvou poolů 14nt dlouhého, vždy 48-krát degenerovaného, z pozdějšího tryptického fragmentu). 32-krát degenerovaný 17merový pool byl použit pro screening lidské genomické DNA knihovny v Ch4A vektoru (22) za použití modifikace Woo-a a O'Malleye v in situ amplifikačním postupu (47) pro přípravu filtrů pro screening.

20 Arabské číslice v závorkách (1) až (60) jsou použity pro označení publikací, které jsou uvedeny podle čísel na konci tohoto popisu.

25 Fágy, hybridizující k 17meru, byly vybrány, spojeny do malých skupin a sondovány se 14merovými a 18merovými pooly. Fágy, hybridizující k 17merovým, 18merovým a 14merovým poolům, byly plakově čištěny a fragmenty byly subklonovány do M13 vektorů pro sekvenaci dideoxy-řetězec ukončující metodou podle





Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	80
<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Pro</u>	<u>Trp</u>	<u>Glu</u>	<u>Pro</u>	<u>Leu</u>	<u>Gln</u>	<u>Val</u>	<u>Ile</u>	<u>Val</u>	<u>Asp</u>	<u>Lys</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	100
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
110	130	150																	
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Pho	Arg	140
Leu	Pho	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Pho	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
160	166																		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg														
SII																			

Tabulka 2 (pokrač.)



Tabulka 3 (pokrač.)

130																					
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	140		
CCA	GAT	GCC	GCC	TCA	TCA	GCT	GCT	CCA	CTC	CGA	ACA	ATC	ACT	GCT	GAC	ACT	TTC	CGC	Lys		
AAA																			AAA		
150																					
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	160	
CTC	TTC	CGA	GTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGG	GCA	MAG	CTG	MAG	CTG	TAC	ACA	CGC	GAG	GCC		
SH																					
166																					
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg																
TCC	ACC	ACA	GCG	GAC	ACA	TCA	cauGStE														
gctctgtgcca	caccctcccc	caccgtgcca	ccatggacac	ccacagggcc	ccacagggcc	atgctgggaa	ctctaccctgtt	ctctggacttc	ctgggaaacca	gacctcacttE	acagtgactg	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt	gctctctgctt
ccatggacac	ccacagggcc	ccatggacac	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc
ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc	ccacagggcc

Sangera a Coulsona (23)(1977). Sekvence regionu, hybridizujícího ke 32násobně degenerovanému 17meru v jednom z klonů, je uvedena v tabulce 1. DNA sekvence obsahuje v otevřeném čtecím rámečku nukleotidy, které by mohly přesně kódovat tryptický fragment, použitý k odvození 17merového poolu oligonukleotidů. Dále analýza DNA sekvence indikuje, že 17merový hybridizující region byl obsažen v 87bp exonu, navázaném v místech potenciálního sestřihu akceptoru a donoru.

Pozitivní potvrzení, že tyto dva klony (zde označené jako lambda-HEP01 a lambda-HEP02) jsou EPO genomické klony, byly získány sekvenováním dalších exonů, obsahujících jiný tryptický fragment kódující informaci.

#### Izolace EPO cDNA klonů

Byla provedena Northern analýza (56) lidské fetální (20 týdnů staré) jaterní MRNA za použití 95nt jednořetězcové sondy, připravené z M13 klonu, obsahující část 87bp exonu, popsáno v tabulce 1. Jak je ilustrováno na obr. 1, bylo možno detekovat silný signál ve fetální jaderné MRNA. Přesná identifikace tohoto pásu jako EPO MRNA byla provedena za použití stejné sondy ke screeningu bakteriofágové lambda cDNA knihovny fetální jaterní mRNA (25). Bylo získáno několik hybridizujících klonů při frekvenci přibližně 1 pozitivní na 250 000 rekombinantů. Kompletní nukleotid a odvozené od těchto klonů (lambda-HEPOFL13 a lambda-HEPOFL8) jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6. EPO kódující informace je obsažena v 594nt v 5-konec polovině cDNA, zahrnující velmi hydrofobní 27 aminokyselinový leadr a 166 aminokyselinový zralý protein.

Identifikace N-konce zralého proteinu byla založena na N-koncové sekvenci proteinu, sekretovaného do moči osob s aplastickou anémií, viz tabulka 1, a jak publikoval Goldwasser (26), Sue a Sytkowski (27) a Yangawa (21). Zda tento N-konec (Ala-Pro-Pro-Arg-) představuje skutečný N-konec, navázaný na EPO v oběhu, nebo zda probíhá nějaké štěpení v ledvinách nebo moči, není v současné době známo.

Aminokyselinové sekvence, které jsou podtrženy v tabulkách 2 a m označují ty typické fragmenty nebo části, ze kterých byla získána proteinová sekvence. Dedukovaná sekvence přesně souhlasí s tryptickými fragmenty, které byly sekvenovány, potvrzuje, že izolovaný gen kóduje lidský EPO.

#### Struktura a sekvence lidského EPO genu

Relativní polohy DNA inzertů čtyř nezávislých lidských EPO genomických klonů jsou uvedeny na obr. 3. Hybridizační analýza těchto klonů s oligonukleotidovými sondami a s různými sondami, připravenými ze dvou tříd EPO cDNA klonů, umísťuje EPO gen do přibližně 3,3 kb oblasti, znázorněné na obr. 3 tmavou čarou. Kompletní sekvenční analýza této oblasti (viz příklad 4) a porovnání s cDNA klony vede k mapě intronové a exonové struktury EPO genu, uvedené na obr. 4. EPO gen je rozdělen do 5 exonů. Část exonu I, celé exony II, III a IV a část exonu V, obsahují protein kódující informaci. Zbylé exony I a V kódují 5-konec a 3-konec netranslatované sekvence.

#### Přechodná exprese EPO v COS buňkách

K demonstrování, že biologicky aktivní EPO by mohl být exprimován v in vitro buněčném systému, byla provedena COS buněčná expresní studie (58). Vektor, použitý pro přechodné studie, p91023(B), je popsán v příkladu 5. Tento vektor obsahuje adenovirový hlavní pozdní promotor, SV40 polyadenylační sekvenci, SV40 původ replikace, SV40 enhancer a adenovirový VA gen. cDNA inzert v lambda-HEPOFL13 (viz tabulka 6) byla inzertována do p91023(B)

vektoru po směru od hlavního pozdního promotoru. Tento nový vektor je označen jako PPTFL13.

5 Dvacet čtyři hodiny po transfekci tohoto konstruktu do M6 kmene COS-1 buněk (Horowitz a spol., J. Mol. Appl. Genet. 2:147-149 (1983)), byly buňky promyty, přemístěny do séra prostého média a buňky byly sklizeny o 48 hodin později. Hladina uvolnění EPO do supernatantu kultury pak byla hodnocena za použití kvantitativní radioimunoassaye pro EPO (55). Jak je uvedeno v tabulce 8 (příklad 6), byl exprimován imunologicky reaktivní EPO. Biologická aktivita EPO, produkovaného z COS-1 buněk, byla také hodnocena. V odděleném pokuse byl vektor, obsahující EPO cDNA z lambda-HEPOFL13, transfektován do COS-1 buněk a médium bylo sklizeny, jak popsáno výše. EPO v médiu byl pak kvantifikován buď ve dvou in vitro biologických zkouškách, <sup>3</sup>H-thymidinem a CFU-E (12, 29), a buď dvěma in vivo zkouškami, hypoxickou myší a vyhledovou myší (30, 31) (viz tabulka 9, příklad 7). Tyto výsledky demonstrují, že biologicky aktivní EPO je produkován v COS-1 buňkách. Při Western-blottingu za použití polyklonální anti-EPO protilátky, EPO, produkovaný COS buňkami, má mobilitu na SDS-polyakrylamidových gelech, která je identická s mobilitou nativního EPO, připraveného z lidské moče (příklad 8). Rozsah glykosylace EPO, produkovaného COS-1, může být podobný jako u nativního EPO.

20 Různé vektory, obsahující jiné promotory, mohou být také použity v COS buňkách nebo v jiných savčích nebo eukaryotických buňkách. Příklady takových jiných promotorů, vhodných při provedení vynálezu, zahrnují SV40 časný a pozdní promotor, promotor myšičího metallothioneinového genu, promotor, nalezený v dlouhých terminálních opakováních ptačích nebo savčích retrovirech, promotor bakulovirového polyhedron genu a jiné. Příklady typů jiných buněk, vhodných v praktickém provedení tohoto vynálezu, zahrnují E.coli, kvasinkové, savčí buňky, jako jsou CHO (vaječník čínské křečka), C127 (opičí epitel), 3T3 (myšičí fibroblast), CV-1 (ledviny africké opice – African green monkey kidney) a hmyzí buňky, jako jsou buňky ze Spodoptera frugiperda a Drosophila melanogaster. Tyto alternativní promotory a/nebo buněčné typy mohou umožňovat regulaci načasování nebo hladiny EPO exprese, produkce buněčně specifických typů EPO nebo růstu velkých množství EPO produkujících buněk za méně nákladných, snadněji kontrolovatelných podmínek.

35 Expresní systém, který si zachovává výhody savčí exprese, ale vyžaduje kratší dobu pro redukci vyšší hladiny exprese buněčné linie, se skládá z hmyzí buněčné linie a DNA viru, který se reprodukuje v této buněčné linii. Virus je virus jaderné polyhedrozy. Má dvojvláknový cirkulární DNA genom o velikosti 128 kb. Nukleokapsid je tyčkovitě tvarován a nalézá se obalen ve dvou formách, neokludované formě viru, prorůstajícího membránou, a okludované formě, obalené v proteinovém krystalu v jádru infikované buňky. Tyto viry mohou být rutinně propagovány v in vitro hmyzí buněčné kultuře a jsou přizpůsobivé všem rutinním virovým metodám u živočichů. Médium buněčné kultury je typicky živný solný roztok a 10% fetální telecí sérum.

45 In vitro je růst viru iniciován, jestliže neokludovaný virus (NOV) vstupuje do buňky a přechází do jádra, kde se replikuje. Replikace je jaderná. Během počáteční fáze (8-18 h po infekci) virové aplikace jsou nukleokapsidy shromážděny v jádře a následně prorůstají plazmovou membránou jako NOV, a rozšiřují infekci v buněčné kultuře. Navíc některé nukleokapsidy následně (18+ h po infekci) zůstávají v jádře a jsou okludovány v proteinové matici a jsou známy jako polyhedrální inkluzní tělísko (PIB). Tato forma není v buněčné kultuře infekční. Matrice je složena z proteinu, známého jako polyhedrin, mol. hmotnost 33 kd. Každý PIB má přibližně 1 μm v průměru a v jádře může být až 100 PIB. V pozdní fázi infekčního cyklu je produkován tak velký podíl polyhedrinu, činící až 25 % celkového buněčného proteinu.

Protože PIB nehraje žádnou roli v in vitro replikačním cyklu, může být polyhedrinový gen deletován z virového chromozomu bez ovlivnění životaschopnosti in vitro. Při použití viru jako expresního vektoru byla nahrazena polyhedrinový gen kódující oblast cizí DNA, která má být

exprimována, a byla tak umístěna pod kontrolou polyhedrinového promotoru. Výsledkem je virový fenotyp, netvořící PIB.

5 Tento systém byl použit několika výzkumníky, z nichž jsou nejčastěji uváděni Pennock a spol. a Smith a spol. Pennock a spol. (Gregory D. Pennock, Charles Shoemaker a Louis K. Miller, *Molecular and Cell Biology* 3:84, str. 399–406) popisují vysokou hladinu exprese bakteriálního proteinu, B-galaktosidázy, jestliže je umístěn pod kontrolou polyhedrinového promotoru.

10 Jiný expresní vektor, odvozený od jaderného polyhedrozního viru, byl popsán Smithem a spol. (Gale E. Smith, Max D. Summers a M. J. Fraser, *Molecular and Cell Biology*, 16. května 1983, str. 2156–2165). Tito autoři demonstrovali účinnost svého vektoru v expresi lidského B-interferonu. Syntetizovaný produkt byl sledován glykosylovaným a sekretovaným z hmyzích buněk, jak bylo očekáváno. V příkladu 14 jsou popsány modifikace plazmidu, obsahujícího *Autographa californica* jaderný polyhedrosis virový (AcNPV) polyhedronový gen, které  
15 umožňují snadnou inzerci EPO genu do plazmidu, takže může být pod transkripční kontrolou polyhedrinového promotoru. Výsledná DNA je ko-transfektována intaktní chromozómovou DNA ze standardního typu AcNPV do hmyzích buněk. Genetická rekombinace vede k nahrazení AcNPVC oblasti polyhedrinového genu DNA z plazmidu. Výsledný rekombinantní virus může být identifikován mezi virovým potomstvem tím, že vykazuje DNA sekvence EPO genu. Tento  
20 rekombinantní virus má po reinfekci hmyzích buněk produkovat EPO.

Příklady EPO exprese v CHO, C127 a 3T3 a hmyzích buňkách jsou uvedeny v příkladech 10 a 11 (CHO), 13 (C127 a 3T3) a 14 (hmyzí buňky).

25 Rekombinantní EPO, produkováný v CHO buňkách, jako v příkladu 11, byl čištěn běžnými metodami sloupcové chromatografie. Relativní množství cukrů, přítomných v glykoproteinu, byla analyzována dvěma nezávislými metodami [(i) Reinold, *Methods in Enzymol.* 50:244–249 (Methanolysis) a (II) Takemoto H. a spol., *Anal. Biochem.* 145:245 (1985) (pyridylaminace, spolu s nezávislým stanovením kyseliny sialové)]. Výsledky, získané v každé metodě, byly ve  
30 vynikajícím souladu. Bylo provedeno několik stanovení, poskytujících následující průměrné hodnoty, kde N-acetylglukosamin je pro srovnávací účely označen hodnotou 1:

Cukr	Relativní molární hladina	
N-acetylglukosamin	1	
hexózy:	1,4	
galaktóza		0,9
mannóza		0,5
kyselina N-acetyl-uraminová	1	
fukóza	0,2	
N-acetylgalaktosamin	0,1	

35 Je třeba uvést, že významné hladiny fukózy a N-acetylgalaktosaminu byly reprodukovatelně pozorovány za použití obou nezávislých metod analýzy cukrů. Přítomnost N-acetylgalaktosaminu indikuje přítomnost O-napojené glykosylace na proteinu. Přítomnost O-napojené glykosylace byla dále indikována SDS-PAGE analýzou glykoproteinu s následujícím štěpením glykoproteinu s různými kombinacemi glykosidických enzymů. Po enzymatickém odštěpení  
40 všech N-napojených karbohydrátů na glykoproteinech za použití enzymu peptid endo F N-glykosidáza, byla molekulová hmotnost proteinu dále snižována následujícím štěpením s neuraminidázami, jak bylo stanoveno pomocí SDS-PAGE analýzy.

In vitro biologická aktivita čištěného rekombinantního EPO byla zkoušena metodou G. Krystala, *Exp. Hematol.* 11:649 (1983) (biozkouška proliferace slezinných buněk) s proteinovými  
45 ukončeními, vypočtenými na základě údajů o aminokyselinovém složení. Po vícenásobných

ukončeních byla in vitro specifická aktivita čištěného rekombinantního EPO vypočtena jako vyšší než 200 000 jednotek/mg proteinu. Průměrná hodnota byla v rozmezí asi 275 000–300 000 jednotek/mg proteinu. Navíc byly také pozorovány hodnoty vyšší než 300 000. Poměry in vivo/polycytemická zkouška na myších, Kazal a Erslev, Am. Clinical Lab. Sci., Vcl. B, str. 91 (1975)/in vitro aktivity, pozorované pro rekombinantní materiál, byly v rozmezí 0,7 až 1,3.

Je zajímavé porovnat glykoproteinové charakteristiky, uvedené výše pro rekombinantní CHO–produkovaný EPO materiál, dříve uvedený v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 85/02610 (publikované 20. června 1985). Odpovídající srovnatelná analýza cukrů, popsána na str. 65 této přihlášky, udává nulovou hodnotu pro fukózu a pro N–acetylglaktosamin a poměr hexózy:N–acetylglaktosamin 15,09:1. Nepřítomnost N–acetylglaktosaminu indikuje nepřítomnost O–napojené glykosylace ve dříve uváděném glykoproteinu. Na rozdíl od tohoto materiálu, rekombinantní CHO–produkovaný EPO podle tohoto vynálezu, který je charakterizován výše, obsahuje významná a reprodukovatelná pozorovatelná množství jak fukózy, tak N–acetylglaktosaminu, obsahuje méně než jednu desetinu relativního množství hexóz a je charakterizován přítomností O–napojené glykosylace. Dále může být vysoká specifická aktivita výše popsaného CHO–získaného rekombinantního EPO podle tohoto vynálezu přímo vztažena ke svému charakteristickému glykosylačnímu uspořádání.

Biologicky aktivní lidský erythropoietin, produkovaný podle vynálezu eukaryotickou expresí klonované DNA pro EPO, která byla definována výše, může být použit lékaři a/nebo veterináři pro in vivo léčbu savců. Množství účinné složky bude samozřejmě záviset na intenzitě léčené choroby, zvoleném způsobu podávání a specifické aktivitě aktivního EPO a v konečné podobně bude stanoveno příslušným lékařem nebo veterinářem. Takové množství aktivního EPO, stanovené příslušným lékařem, je zde také označováno jako „léčebně účinné EPO“ množství. Například v léčbě indukované hypoproliferativní anémie, spojené s chronickým selháním ledvin u ovce, bylo účinné denní množství EPO nalezeno 10 jednotek/kg po 15 až 40 dnů. Viz Eschbach a spol., J. Clin. Invest., 74:434 (1984).

Účinný EPO může být podáván jakýmkoliv způsobem, vhodným pro stav, který je léčen. Výhodně je EPO injektován do krevního proudu léčeného savce. Odborníkoví v oboru bude zřejmé, že preferovaný způsob podání se bude měnit podle léčeného stavu.

U účinného EPO je možné, aby byl podáván jak jako čistá, tak v podstatě čistá sloučenina, je výhodná ho podávat ve formě farmaceutické formulace nebo preparátu.

Formulace (tj. kompozice či prostředky) jak pro veterinární, tak humánní použití, obsahují účinný EPO protein, jak je popsán výše, spolu s jedním nebo více jeho farmaceuticky přijatelnými nosiči a popřípadě další terapeutické složky. Nosič(e) musí být přijatelné v tom smyslu, že jsou kompatibilní s jinými složkami formulace a neškodí jejímu příjemci. Je žádoucí, aby formulace neobsahovala oxidační činidla a jiné substance, o kterých je známo, že nejsou s peptidy kompatibilní. Formulace může být výhodně ve formě jednotkové dávkové formy a může být připravena jakoukoliv metodou, známou v oboru farmacie. Všechny metody zahrnují stupeň uvedení do spojení účinné složky s nosičem, který tvoří jedna nebo více pomocných složek. Obecně jsou formulace připraveny homogenním a dokonalým spojením účinné složky s kapalnými nosiči nebo jemně dělenými pevnými nosiči nebo oběma typy nosičů, a pak jsou, je-li to nezbytné, tvarovány produkty do požadovaného tvaru.

Formulace, vhodné pro parenterální podání, obvykle zahrnují sterilní vodné roztoky účinné složky s roztoky, které jsou výhodně izotonické s krví příjemce. Takové formulace mohou být výhodně připraveny rozpuštěním pevné účinné složky ve vodě za vzniku vodného roztoku a sterilizací roztoku v jedno nebo vícedávkových nádobkách, například zatavených ampulích nebo lahvičkách.

Výraz „EPO/cDNA“, používaný v tomto textu, zahrnuje zralý EPO/cDNA gen, jemuž předchází ATG kodon, a EPO/cDNA kódující EPO protein, znázorněný v tabulkách 2 a 3. Epo protein zahrnuje 1-methioninový derivát EPO proteinu (Met-EPO). Zralý EPO protein, ilustrovaný sekvencemi v tabulce 2, začíná sekvencí Ala-Pro-Pro-Arg..., jejíž začátek je v tabulce 2 označen číslem „1“. Met-EPO by začínal sekvencí Met-Ala-Pro-Pr-Arg...

Následující příklady slouží lepšímu porozumění vynálezu, jehož rozsah je dán připojenými nároky. Všechny teploty jsou udávány ve stupních Celsia a nejsou korigovány. Symbol mikron nebo mikro, např. mikrolitr, mikromol atd., je „u“, např. ul, um atd.

### Příklady provedení vynálezu

#### 15 Příklad 1

##### Izolace genomického klonu EPO

EPO byl čištěn z moči pacientů s aplastickou anémií v podstatě, jak bylo popsáno dříve (Miyake a spol., J. Biol. Chem., 252:5558 (1977)) s tím rozdílem, že bylo vynecháno zpracování s fenolem a nahrazeno tepelným zpracováním při 80 stupních po 5 min pro inaktivaci neuraminidázy. Konečný stupeň v čištění byla frakcionace na C-4 Vydac HPLC koloně (The Separation Group) s použitím 0 až 95% acetonového gradientu s 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TFA) během 100 minut. Poloha EPO v gradientu byla stanovena gelovou elektroforézou a N-terminální sekvenční analýzou (21, 26, 27) hlavních píků. EPO byl eluován přibližně 53% acetonitrilem a představuje přibližně 40 % proteinu, podrobeného HPLC s reverzní fází. Frakce, obsahující EPO, byly odpařeny na 100  $\mu$ l, upraveny na pH 7,0 hydrogenuhličitanem amonným, dokonale štěpeny 2% TPCK-zpracovaným trypsinem (Worthington) po 18 hodin při 37 stupních. Produkt tryptického štěpení byl pak podoben HPLC s reverzní fází, jak je popsáno výše. Byla sledována optická hustota jak při 280, tak 214 nm. Dobře oddělené píky byly odpařeny téměř dosucha a podrobeny přímo N-terminální aminokyselinové sekvenční analýze (59) za použití Applied Biosystems Model 480Ab sekvenátoru v plynné fázi. Získané sekvence jsou v tabulkách 2 a 3 podtrženy. Jak je zde uvedeno výše, byly dva z těchto tryptických fragmentů zvoleny pro syntézu oligonukleotidových sond. Ze sekvence Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys byly

35 připraveny (aminokyseliny 46 až 52 v tabulkách 2 a 3)

17mer 32násobné degenerace

TTCCANGCGTAGAAGTT,

a 18 mer 128násobné degenerace

CCANGCGTAGAAGTTNAC.

40 Ze sekvence Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg (aminokyseliny 144 až 150 v tabulkách 2 a 3) byly připraveny dva pooly 14merů, každý 32násobné degenerován

TACACCTAACTTCCT a TACACCTAACTTCTT,

45 které se liší v první poloze připraveného leucinového kodonu. Oligonukleotidy jsou značeny na 5-konec konci pomocí  $^{32}$ P použitím polynukleotid-kinázy (New England Biolabs) a gamma  $^{32}$ P-ATP (New England Nuclear). Specifická aktivita oligonukleotidů se měnila mezi 1000 a 3000 Ci/mmol oligonukleotidu. Lidská genomická DNA knihovna v bakteriofágu lambda (Laen a spol., 22) byla screenována za použití modifikace in situ amplifikačního postupu, původně popsaného Woo-em a spol. (47)(1978). Přibližně  $3,5 \times 10^5$  fágů bylo umístěno v hustotě 6000 fágů na 150 mm Petriho misku (NZCYM médium) a inkubováno při 37 stupních do viditelných plaků, které jsou však malé (přibližně 0,5 mm). Po 1 hodině chlazení při 4 stupních byly duplikátové kopie vzorků plaků přeneseny na nylonové membrány (New England Nuclear) a inkubovány přes noc při 37 stupních na čerstvých NZCYM plotnách. Filtry pak byly denaturovány a neutralizovány 10minutovým pobytem vždy po 10 min na tenkém filmu 0,5N NaOH - 1M NaCl a 0,5M Tris (pH 8) - 1M NaCl. Po vakuovém sušení při 80 stupních po 50 2 hodiny byly filtry promyty v 5 x SSC, 0,5% SDS po 1 h a buněčné zlomky na povrchu filtru

55

byly odstraněny mírným škrábáním vlhkou tkaninou. Toto škrábání redukuje podstatnou vazbu sondy k filtrům. Filtry pak byly promyty vodou a prehybridizovány po 4 až 8 hodin při 48 stupních ve 3M tetramethylamoniumchloridu, 10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 6,8), 5 x Denhardtově roztoku, 0,5% SDS a 10 mM EDTA. <sup>32</sup>P značený 17mer byl pak přidán v koncentraci 0,1 pmol/ml a hybridizace byla provedena při 48 stupních po 72 h. Po hybridizaci byly filtry intenzivně promyty 2 x SSC (0,3M NaCl- 0,03M Na-citrát, pH 7) při teplotě místnosti a pak 1 h ve 3M TMACl - 10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 6,8) při teplotě místnosti a od 5 do 15 min při hybridizační teplotě. Přibližně 120 silných duplikátových signálů bylo detekováno 2 dny po autoradiografii za intenzifikačního screeningu. Pozitiva byla vybrána, shromážděna po 8 a znovu třikrát rescreenována za použití jedné poloviny 14merového poolu na každém ze dvou filtrů a 127 meru na třetím filtru. Podmínky a 17mer pro umístění na plotnu jsou popsány výše s výjimkou, že hybridizace pro 14mer byla při 37 stupních. Po autoradiografii byly sondy odstraněny ze 17merového filtru v 50% formamidu po 20 min při teplotě místnosti a filtrát byl rehybridizován při 52 stupních s 18merovou sondou. Dva nezávislé fágy hybridizují ke všem třem sondám. DNA z jednoho z těchto fágů (zde označen lambda HEPO1) byla dokonale štěpena pomocí Sau3A a subklonována do M13 pro DNA sekvenční analýzu za použití dideoxy řetězec terminující metody podle Sanger a Coulsona, (23)(1977). Nukleotidová sekvence a odvozená aminokyselinová sekvence otevřeného čtecího rámečku, kódující pro EPO tryptický fragment (podtržená oblast), jsou zde popsány. Intronové sekvence jsou uvedeny malými písmeny, exonové sekvence (87nt) velkými písmeny. Sekvence, které souhlasí s místy akceptorového (a) a donorového (d) střihu, jsou podtrženy (viz tabulka 4).

#### Příklad 2

25

#### Northern analýza mRNA jater lidského plodu

5 ug mRNA jater lidského plodu (připravené z jater 20týdenního lidského fetu) a mRNA jater dospělého člověka bylo elektroforezováno v 0,8% agarosovém formaldehydovém gelu a transferováno na nitrocelulózu za použití metody Dermana a spol., Cell, 23:731 (1981). Jednořetězcová sonda pak byla připravena z M13 templátu, obsahujícího inzert, ilustrovaný v tabulce 1. Konec byl 20mer, získaný ze stejného tryptického fragmentu, jako původní 17merová sonda. Sonda byla připravena, jak popsal Anderson a spol., PNAS, (50)(1984) s tím rozdílem, že následuje štěpení pomocí Amal (které produkuje požadovanou sondu délky 95nt, obsahující 74nt kódující sekvence), malý fragment byl čištěn z m13 templátu chromatografií na sloupci sepharose C14B

35







v 0,1N NaOH–0,2M NaCl. Filtr byl hybridizován k přibližně  $5 \times 10^6$  cpm této sondy po 12 hodin při 68 stupních, promyt ve 2 x SSC při 68 stupních a vystaven 8 dnů intenzivnímu screeningu. Jediná markerová mRNA o 1200 nt (označeno šipkou) probíhala v sousední dráze (obr. 1).

5

### Příklad 3

#### cDNA z jater plodu

10

Byla připravena sonda, shodná se sondou, popsanou v příkladu 2, a byla použita ke screeningu cDNA knihovny jater plodu, připravené ve vektoru lambda–Ch21A (Toole a spol., Nature, (25)(1984) za použití standardního screeningového (Benton Davis, Science, (54)(1978)) postupu. Tři nezávislé pozitivní klony (označené zde lambda–HEPOFL6 (1350bp), lambda–HEPOFL8 (700 bp) a lambda–HEPOFL3 (1400 bp) byly izolovány po screeningu  $1 \times 10^6$  plaků. Celý inzert lambda–HEPOFL13 a lambda–HEPOFL6 byly sekvenovány po subklonování do M13. (Tabulka 7 a 5). Pouze části lambda–HEPOFL8 byly sekvenovány a zbytek byl považován za shodný s ostatními dvěma klony (tabulka 6). 5–konec a 3–konec netranslatované sekvence jsou uváděny malými písmeny. Kódující oblast je zapsána písmeny velkými.

20

V tabulkách 2 a 3 je dedukovaná aminokyselinová sekvence uvedena pod nukleotidovou sekvencí a je číslována tak, že číslo 1 platí pro první aminokyselinu maturovaného proteinu. Předpokládaný vedoucí peptid (leader peptid) je označen zápisem celých zkratk pro zápis aminokyselin. Cysteinové zbytky ve zralém proteinu jsou dále označeny SH a potenciální N–napojená glykosylační místa hvězdičkou. Aminokyseliny, které jsou podtrženy, označují ty zbytky, identifikované N–terminálním proteinovým sekvenováním nebo sekvenováním tryptických fragmentů EPO, jak je popsáno v

25

Tabulka 5

cctcccacagc		caccctctctc		cctcccagcc		tgcctctctcag		cctggctctatc		tggctccagaa		cys		pro	
ctcccacagc		caccctctctc		cctcccagcc		tgcctctctcag		cctggctctatc		tggctccagaa		tct		cct	
ctcccacagc		caccctctctc		cctcccagcc		tgcctctctcag		cctggctctatc		tggctccagaa		tct		cct	
ala	trp	leu	trp	leu	leu	ser	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	gly
ccc	tcc	ctc	tcc	ctc	ctc	tcc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ccc
1															
ala	pro	pro	arg	leu	ile	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr
ccc	cca	cca	ccc	ctc	atc	atc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc
10															
ala	ala	glu	asn	ile	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr	thr
gag	ccc	cag	aat	atc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc
40															
val	pro	asp	thr	lys	val	asn	phe	tyr	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala
ctc	cca	cac	acc	aaa	gtt	aat	ttc	tat	ccc	ccc	ccc	ccc	ccc	ccc	ccc
50															
val	glu	val	trp	gln	gly	gln	leu	ala	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu
cta	gaa	gtc	tcc	tcc	ctc	ctc	ccc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc
70															
leu	val	asn	ser	ser	gln	pro	trp	gln	pro	trp	gln	pro	trp	gln	pro
ttc	gtc	aac	tct	tcc	cag	ccc	tcc	cag	ccc	tcc	cag	ccc	tcc	cag	ccc
80															
gly	leu	arg	ser	leu	thr	thr	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu
ggc	ctt	ccc	acc	ctc	acc	act	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc
110															
pro	pro	asp	ala	ala	ser	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala
cct	cca	gat	ccc	ccc	tca	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct
120															
gly	leu	arg	ser	leu	thr	thr	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu
ggc	ctt	ccc	acc	ctc	acc	act	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc
130															
pro	pro	asp	ala	ala	ser	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala
cct	cca	gat	ccc	ccc	tca	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct
140															
gly	leu	arg	ser	leu	thr	thr	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu	leu
ggc	ctt	ccc	acc	ctc	acc	act	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc
150															
pro	pro	asp	ala	ala	ser	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala	ala
cct	cca	gat	ccc	ccc	tca	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct	gct





Tabulka 6 pokrač.)

Leu TTC	Val CTC	Asn AAC	Ser TCT	Ser TCC	Gln CAG	Pro CCG	Trp TCC	Glu GAG	Pro CCC	Leu CTG	Gln CAG	Leu CTC	His CAT	Val GTG	Asp GAT	Lys AAA	Ala GCC	Val GTC	100 Ser ACT
Gly GGC	Leu CTT	Arg CGC	Ser AGC	Leu CTC	Thr ACC	Thr ACT	Leu CTC	Leu CTT	Arg CGG	Ala GCT	Leu CTG	Gly GGA	Ala GCC	Gln CAG	Lys AAG	Glu GAA	Ala GCC	Ile ATC	120 Ser TCC
Pro CCT	Pro CCA	Asp CAT	Ala GCG	Ala GCC	Ser TCA	Ala GCT	Ala GCT	Pro CCA	Leu CTC	Arg CGA	Thr ACA	Ile ATC	Thr ACT	Ala GCT	Ala GAC	Thr ACT	Phe TTC	Arg CGC	140 Lys AAA
Leu CTC	Phe TTC	Arg CGA	Val GTC	Tyr TAC	Ser TCC	Asn AAT	Phe TTC	Leu CTC	Arg CGG	Gly CCA	Lys AAC	Leu CTC	Lys AAG	Leu CTC	Tyr TAC	Thr ACA	Gly CCG	Glu GAG	





příkladu 1. Částečné podtržení označuje zbytky v aminokyselinové sekvenci určitých tryptických fragmentů, které nemohly být stanoveny jednoznačně. cDNA klony lambda-HEPOFL8 a lambda-HEPOFL13 byly screenovány, uloženy a jsou dostupné z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC 40156, ATCC 40152 a ATCC 40153.

#### Příklad 4

##### Genomická struktura EPO genu

Relativní velikosti a polohy čtyř nezávislých genomických klonů (lambda-HEPO1, 2, 3 a 6) z knihovny HaeIII/AluI jsou ilustrovány překrývajícími se čarami na obr. 3. Silná čára označuje polohu EPO genu. Je uvedena stupnice (v kb) a polohy známých míst štěpení restriční endonukleázou. Oblast, obsahující EPO gen, byla kompletně sekvenována z obou řetězců za použití řízené série delecí v této oblasti. Schematické znázornění pěti exonů, kódujících EPO mRNA, je uvedeno na obr. 4. Přesná 5-konec vazba exonu I je v současnosti neznámá. Protein kódující podíly exonů jsou tmavší. Kompletní nukleotidová sekvence oblasti je uvedena v tabulce 4. Známé hranice každého exonu jsou označeny pomocí silných vertikálních čar. Genomické klony lambda-HEPO1, lambda-HEPO2, lambda-HEPO3 a lambda-HEPO6 byly uloženy a jsou dostupné z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC 40154, ATCC 40155 a ATCC 40150 a ATCC 40151.

#### Příklad 5

##### Konstrukce vektoru p91023(b)

Transformačním vektorem byl pAdD26SVpA(3), popsán Kaufmanem a spol., Mol. Cell Biol., 2:1304 (1982). Struktura tohoto vektoru je uvedena na obr. 5A. Stručně, tento plazmid obsahuje gen cDNA myši dihydrofolát reduktázy (DFHR), který je pod transkripční kontrolou adenovirus 2 (Ad2) hlavního pozdního promotoru. 5-konec stříhové místo je indikováno v adenovirové DNA a 3-konec stříhové místo, odvozené od imunoglobulinového genu, je přítomno mezi Ad2 hlavním pozdním promotorem a DFHR kódující sekvencí. SV40 časně polyadenylační místo je přítomno za DFHR kódující sekvencí. Prokaryoticky odvozená sekce pAdD26SVpA(3) je z pSV0d (Mellon a spol., Cell, 27:279(1981)) a neobsahuje pBR322 sekvence, o nichž je známo, že inhibují replikaci v savčích buňkách (Lusky a spol., Nature, 293:79 (1981)).

pAdD26SVpA(3) byl převeden na plazmid pCVSVL2, jak je ilustrováno na obr. 5A. pAdD26SVpA(3) byl převeden na plazmid pAdD26SVpA(3) (d) delecí jednoho ze dvou PstI míst v pAdD26SVpA(3). Toto bylo provedeno parciálním štěpením pomocí PstI za použití deficitu enzymu tak, aby byla získána subpopulace linearizovaných plazmidů, ve kterých bylo štěpeno pouze jedno PstI místo, s následujícím zpracováním Klenowem, ligací pro recirkulaci a screeningem na delecí PstI místa umístěného 3-konec k SV40 polyadenylační sekvenci.

Adenovirový trojdílný leader a s virem spojené geny (VA geny) byly inzertovány do pAdD26SVpA(3) (d), jak je ilustrováno na obr. 5A. Nejprve byl pAdD26SVpA(3) (d) štěpen pomocí PvuII pro získání lineární molekuly, otevřené ve 3-konec části tří elementů, tvořících trojdílný leader. Potom byl pJAW 43 (Zain a spol., Cell, 16:851 (1979)) zpracován s Klenowem, štěpen pomocí PvuII a 140bp fragment, obsahující druhou část třetího leaderu, byl izolován elektroforézou na akrylamidovém gelu (6% ve Tris borátovém pufru; Maniatis a spol., supra). 140bp fragment byl pak ligován do PvuII štěpeného pAdD26SVpA(3) (d). Ligační produkt byl použit ke transformaci E.coli na tetracyklinovou rezistenci a kolonie byly screenovány za použití Grunstein-Hognessova postupu za použití <sup>32</sup>P značené sondy, hybridizující ke 140 bp fragmentu. DNA byla připravena z pozitivně hybridizujících kolonií pro test, zda PvuII rekonstruované místo bylo 5-konec nebo 3-konec inzertované 140bp DNA specifické ke druhému a třetímu

adenovirovému pozdnímu leaderu. Správná orientace PvuII místa je na 5-koncové straně 140bp inzertu. Tento plazmid je označen tTPL na obr. 5A.

5 Ava II D fragment SV40, obsahující SV40 enhancerovou sekvenci, byl získán štěpením SV40 DNA pomocí Ava II, zatupením konců Klenovým fragmentem pol I, ligací Xho I linkerů k fragmentům, štěpením s Xho I pro otevření Xho I místa a izolací čtvrtého největšího (D) fragmentu gelovou elektroforézou. Tento fragment byl pak ligován k Xho I štěpenému pTPL za vzniku plazmidu pCVSVL2-TPL. Orientace SV40 D fragmentu v pCVSVL2-TPL byla taková, že SV40 pozdní promotor byl ve stejné orientaci jako adenovirový hlavní pozdní promotor.

10 Pro zavedení s adenovirem spojených (VA) genů do pCVSVL2-TPL byl nejprve konstruován plazmid pBR322, který obsahuje adenovirus typ 2 Hind III B fragment. Adenovirus typ 2 DNA byla štěpena s Hind III a B fragment byl izolován gelovou elektroforézou. Tento fragment byl inzertován do pBR322, který byl předem štěpen pomocí Hind III. Po transformaci E.coli na  
15 ampicilinovou rezistenci byly rekombinanty screenovány na inzerci Hind III B fragmentu a orientace inzertu byla stanovena štěpením restriktivním enzymem. pBR322-Ad Hind III B obsahuje adenovirus typ 2 Hind III B fragment v orientaci, znázorněné na obr. 5B.

20 Jak je ilustrováno na obr. 5B, jsou VA geny výhodně získány z plazmidu pBR322-Ad Hind III B štěpením s Hpa I, přidavkem EcoRI linkerů a štěpením pomocí EcoRI a následujícím odstraněním 1,4 kb fragmentu. Fragment, mající EcoRI lepivé konce, se pak liguje do EcoRI místa PTL, předem štěpeného s EcoRI. Po transformaci E.coli HB101 a selekci na tetracyklinovou rezistenci, byly kolonie screenovány filtrovou hybridizací k DNA, specifické pro  
25 VA geny. DNA byla připravena z pozitivně hybridizujících klonů a charakterizována štěpením restriktivní endonukleázou. Výsledný plazmid je označen p91023.

Jak je ilustrováno na obr. 5C, byla dvě EcoRI místa v p91023 odstraněna úplným rozštěpením p91023 pomocí EcoRI za vzniku DNA fragmentů, jeden asi 7kb a druhý asi 1,3kb. Posledně  
30 uváděný fragment obsahuje VA geny. Konce obou fragmentů pak byly vzájemně k sobě ligovány. Plazmid p91023(A), obsahující VA geny, a podobně p91023, ale s delecí dvou EcoRI míst, byly identifikovány pomocí Grunstein-Hognessova screeningu s Va genovým fragmentem a běžnou analýzou restriktivních míst.

Jediné PstI místo v p91023(A) bylo odstraněno a nahrazeno EcoRI místem. p91023(a) byl úplně  
35 rozřezán pomocí PstI a zpracován s Klenovým fragmentem polI pro vytvoření vyrovnaných konců. EcoRI linkery byly ligovány k zatupenému PstI místu p91023(A). Lineární p91023(A) s EcoRI linkery, připojenými k zatupenému PstI místu, byly odděleny od neligovaných linkerů a plně rozštěpeny pomocí EcoRI a religovány. Byl získán plazmid p91023(B), jak je znázorněn na  
40 obr. 5C, a byl identifikován jako mající strukturu podobnou p91023(A), ale s EcoRI místem místo dřívějšího PstI místa. Plazmid p91023(B) byl uložen a je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC 39754.

#### 45 Příklad 6

cDNA klony (lambda-EPOFL6 a lambda-EPOFL13, příklad 3) byly inzertovány do plazmidu p91023(B) za vzniku PPTFL6 a PPTFL13. 8 ug každé z čištěných DNA bylo pak použito  
50 k transfekování  $5 \times 10^6$  COS buněk za použití DEAE-dextranové metody (infra). Po 12 hodinách byly buňky promyty a zpracovány s chloroquinem (0,1 mm) po 2 h, opět promyty a vystaveny 10 ml média, obsahujícího 10 % fetálního telecího séra po 24 hodiny. Médium bylo zaměněno za 4 ml séra prostého média a sklizeno o 48 hodin později.

Produkce imunologicky aktivního EPO byla kvantifikována radioimunozkouškou, jak popsali Sherwood a Goldwasser (55). Protilátka byla poskytnuta Dr. Judith Sherwood. Jodovaný

značkovací byl připraven z homogenního EPO, popsaného v příkladu 1. Citlivost zkoušky je přibližně 1 ng/ml. Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce 8.

5 Tabulka 8

Vektor	hladina EPO uvolněného do média(ng/ml)
pPTFL13	330
pPTFL6	31

PTFL13 byl uložen a je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC 3990.

10

Příklad 7

15 EPO cDNA (lambda-HEPOFL13) byla inzertována do p91023(B) vektoru a byla transfektována do COS-1 buněk a sklizena, jak popsáno výše (příklad 6) s tím rozdílem, že bylo vypuštěno zpracování chloroquinem.

20 In vitro byl stanoven biologicky aktivní EPO pomocí zkoušky tvorby kolonií s buňkami jater myšího plodu jako zdroje CFU-E, nebo zkoušky příjmu <sup>3</sup>H-thymidinu za použití buněk sleziny myši, kterým byla předem podána injekce fenyhydrazinu. Citlivosti těchto zkoušek jsou přibližně 25 milijednotek/ml. In vivo byl biologicky aktivní EPO měřen použitím metod buď hypoxickou myší nebo vyhladovělou krysou. Citlivost těchto zkoušek je přibližně 100 milijednotek/ml. Nebyla detekována žádná aktivita u obou zkoušek ani v kontrolním pokuse. Výsledky EPO, exprimovaného klonem EPOFL13, jsou uvedeny dále v tabulce 9, kde uváděné aktivity jsou vyjádřeny v jednotkách/ml za použití komerčního kvantifikovaného EPO (Toyobo, Inc.) jako standardu.

25

30 Tabulka 9

EPO exprimovaný z COS buněk transfektovaných EPO cDNA typ I

Zkouška	Aktivita
RIA	100 ng/ml
CFU-E	20,5 j./ml
<sup>3</sup> H-Thy	3,1 1,8 j./ml
hypoxická myš	1 j./ml
vyhladovělá krysa	2 j./ml

35 Příklad 8

Analýza EPO z COS buněk na polyakrylamidovém gelu

40 180 ng EPO, uvolněného do média COS buněk, transfektovaných EPO (lambda-HEPOFL13) cDNA ve vektoru 91023(B) (viz výše), bylo elektroforezováno na 10% SDS Laemli polyakrylamidovém gelu a elektrotransferováno na nitrocelulósový papír (Towbin a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979)). Filtr byl sondován s anti-EPO protilátkou, jak je popsána v tabulce 8, promyt a znovu prohledán pomocí <sup>125</sup>I-staph A proteinem. Filtr byl zpracováván autoradiografií po dva dny. Nativní homogenní EPO, popsané v příkladu 1, buď před (dráha B)

nebo po jodaci (dráha C), byly podrobeny elektroforéze (viz obr. 8). Použité markery zahrnují <sup>35</sup>S značený methionin,, sérový albumin (68 000 d) a ovalbumin (450 00 d).

5 Příklad 9

Konstrukce RK1-4

10 Bam HI-PvuII fragment z plazmidu PSV2DHFR (Subramani a spol., Mol. Cell. Biol. 1:854-864 (1981)), obsahující oblast časného promotoru SV40, připojeného ke genu myší dihydrofolát reduktázy (DHFR), SV40 enhancer, malý intron t antigenu a SV40 polyadenylační sekvenci, byl izolován (fragment A). Zbývající fragmenty byly získány z vektoru p91023(A) (viz výše) následovně: p91023(A) byl štěpen pomocí Pst I v jediném Pst I místě, blízkém adenovirovému promotoru, pro linearizaci plazmidu a buď ligován k syntetickým Pst I až EcoRI konverterům a 15 recirkulován (vytvoření míst Pst I - EcoRI - Pst I na původním Pst I místě; 91023(B'), nebo zpracován s velkým fragmentem DNA polymerázy I k rozrušení Pst I míst a ligován k syntetickému EcoRI linkeru a recirkularizován (vytvořením EcoRI místa na původním místě Pst I; 91023(B). Každý ze dvou výsledných fragmentů 91023(B) a 91023(B;) byly štěpeny pomocí Xba a EcoRI za vzniku dvou fragmentů (F a G). Spojením F fragmentu z p91023(B) a 20 fragmentu G z p91023(B') a fragmentu G z p91023(B) a fragmentu F z p91023(B') byly vytvořeny dva nové plazmidy, které obsahují buď EcoRI - Pst I místo nebo Pst I - EcoRI místo na původním Pst I místě. Plazmid, obsahující Pst I - Eco RI místo, kde Pst I místo je nejbližší adenovirovému hlavnímu pozdnímu promotoru, byl nazván p91023(C).

25 Vektor p91023(C) byl kompletně štěpen pomocí XhoI a výsledná linearizovaná DNA s lepivými konci byla zatupena reakcí zaplnění konců s velkým fragmentem E.coli z DNA polymerázy I. K této DNA byl ligován 340 bp Hind III EcoRI fragment, obsahující SV40 enhancer, připravený následovně:

30 Hind III - Pvu II fragment ze SV40, který obsahuje SV40 počátek replikace, a enhancer byl inzertován do plazmidu c lac (Little a spol., Mol. Biol. Med. 1:473-488 (1983)). c lac vektor byl připraven štěpením c lac DNA pomocí BamHI, zaplněním na lepivých koncích velkým fragmentem DNA polymerázy I a štěpením DNA pomocí Hind III. Výsledný plazmid (c SVHPlac) regeneroval BamHI místo při ligaci k Pvu II tupému konci. Fragment EcoRI-Hind III 35 byl připraven z c SVHPlac a ligován k EcoRI-Hind III fragmentu pSV0d (Mellon a spol, supra), který obsahuje plazmidový počátek replikace a byl selektován výsledný plazmid PSVHPOd. Pak byl připraven 340 bp EcoRI-Hind III fragment z PSVHPOd, obsahující SV40 počátek/enhancer, zatupen na obou koncích pomocí velkého fragmentu DNA polymerázy I a ligován k XhoI štěpenému, zatupenému p91023(c) vektoru, popsanému výše. Výsledný plazmid 40 (p91023(C)/Xho/zatupený plus EcoRI/Hind III/zatupený SV40 počátek plus enhancer), ve kterém byla orientace Hind III - EcoRI fragmentu taková, že BamHI místo v tomto fragmentu bylo co nejbližší VA genu, byl označen pES105. Plazmid Pes105 byl štěpen pomocí Bam HI a PvuII a také PvuII samotným a byl izolován BamHI-PvuII fragment, obsahující adenovirový hlavní pozdní promotor (fragment B) a PvuII fragment, obsahující plazmid trvání rezistence genu 45 (tetracyklinová rezistence) a jiné sekvence (fragment C). Fragmenty A, B a C byly ligovány a výsledný plazmid je uveden na obr. 7 a byl izolován a nazván RK1-4. Plazmid RK1-4 byl uložen v American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, kde je dostupný pod přírůstkovým číslem ATCC 399940.

## Příklad 10

## Expres EPO v CHO buňkách – metoda I

5 DNA (20 ug) z plazmidu pPTFL13, popsaného výše (příklad 6), byla štěpena restriční endonukleázou Cla I k linearizaci plazmidu a byla ligována k Cla I–štěpené DNA z plazmidu pAdD26SVP(A) 1 (2 ug), který obsahuje intaktní dihydrofolát reduktázový (DHFR) gen řízený adenovirovým hlavním pozdním promotorem (Kaufman a Sharp, Mol. and Cell. Biol. 2:1304–1319 (1982)). Takto ligovaná DNA byla použita k transfekování DHFR–negativních CHO

10 buněk (DUKS–BII, Chasin L. A. a Urlaub G. (1980) PNAS 77 4216–4220) a ponechána růst dva dny, buňky, které inkorporovaly alespoň jeden DHFR gen, byly selektovány v alfa médiu, postrádajícím nukleotidy a doplněném 10 % dialyzovaného fetálního hovězího séra. Po dvou týdnech růstu v selektivním médiu byly kolonie odstraněny z originálních ploten, spojeny do skupin 10–100 kolonií na skupinu, znovu umístěny na plotnu a ponechány růst do slítí v médiu, postrádajícím nukleotidy. Supernatanty média ze skupin, rostlých před methotrexátovou selekcí, byly zkoušeny na EPO pomocí RIA. Skupiny, které vykazují pozitivní EPO produkci, rostly za přítomnosti methotrexátu (0,02 uM) a pak byly subklonovány a znovu zkoušeny. EPO Cla 4 4.02–7, jediný subklonovaný z EPO Cla 4 4.02 skupiny, uvolňuje 460 ng/ml EPO do média, obsahujícího 0,02 uM MTX (tabulka 10). EPO Cla 4 4.02–7 je buněčná linie volby pro produkci

20 EPO a byla uložena v American Type Culture Collection pod přírůstkovým číslem ATCC CRL8695. V současnosti je tento klon podroben postupné selekci ve zvyšujících se koncentracích MTX a bude pravděpodobně poskytovat buňky, které produkují i vyšší hladiny EPO. Pro skupiny, které na základě RIA byly negativní, byly kolonie, rezistentní k metotrexátu, získány z duplikátních kultur, které rostly za přítomnosti metothrexátu (0,02 uM), opět ve skupinách zkoušeny na EPO pomocí RIA. Tyto kultury, které nebyly pozitivní, byly subklonovány a podrobeny růstu v dále se zvyšujících koncentracích methotrexátu.

Postupná methotrexátová selekce (MTX) byla dosažena opakováním cyklů kultivace buněk za přítomnosti zvyšujících se koncentrací methotrexátu a selekcí přežívajících. V každém cyklu byl měřen EPO v kulturách supernatantu pomocí RIA a in vitro biologické aktivity. Hladiny methotrexátu, použité v každé postupné amplifikaci, byly 0,02 uM, 0,1 uM a 0,5 uM. Jak je uvedeno v tabulce 10, po jednom cyklu selekce v 0,02 uM MTX byly do kultivačního média uvolněny významně vysoké hladiny EPO.

35

Tabulka 10

Vzorek	zkouška	Hladina EPO, uvolněného do média	
		získáno z média alfa	0,02 uM methotrexát v médiu alfa
skupina			
4 4	RIA	17 ng/ml	50 ng/ml
jediná kolonie			
4 4 klon			
(.02–7)	RIA		460 mg/ml

40 Příklad 11

## Expres EPO v CHO buňkách – metoda II

45 DNA z klonu lambda HEPOFL13 byla štěpena pomocí EcoRI a malý fragment, obsahující EPO gen, byl subklonován do EcoRI místa plazmidu RK1–4 (viz příklad 10). Tato DNA (RKFL13) pak byla použita ke transfekci DHFR–negativních CHO buněk přímo (bez štěpení) a selekce a amplifikace byla provedena, jak je popsáno výše v příkladu 10.

RKFL13 DNA byla také inzertována do CHO buněk protoplastovou fúzí a mikroinjekcí. Plazmid RKFL13 byl uložen a je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC 39989.

5

Tabulka 11

Vzorek	zkouška	Hladina EPO, uvolněného do média	
		získáno z média alfa	0,02 uM methotrexát v médiu alfa
skupina			
kolonií			
A	RIA	3 ng/ml	42 ng/ml (skupina)
			150 ng/ml (klon)
	<sup>3</sup> H-Thy	–	1,5 j./ml
jediná	RIA	–	90 ng/ml
kolonie	<sup>3</sup> H-Thy	–	5,9 j./ml
klon(.02C-Z)			
mikroinjektovaná			
skupina	RIA	60 ng/ml	160 ng/ml
(DEPO-1)	<sup>3</sup> H-Thy	1,8 j./ml	–

10 Preferovaný klon jediné kolonie byl uložen a je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem ATCC CRL8695.

## Příklad 12

## 15 Expres EPO genomického klonu v COS-1 buňkách

Pro expresi EPO genomického klonu byl použit vektor pSV0d (Mellon a spol., supra). DNA z pSV0D byla úplně štěpena pomocí Hind III a zatupena s velkým fragmentem DNA polymerázy I. EPO genomický klon lambda-HEP3 byl úplně štěpen s EcoRI a HindIII a 4,0 kb fragment, obsahující EPO gen, byl izolován a zatupen jako výše. Nukleotidová sekvence tohoto fragmentu z Hind III místa do oblasti právě za polyadenylačním signálem je uvedena na obr. 4 a v tabulce 4. EPO genový fragment byl inzertován do pSV0d plazmidového fragmentu a správně konstruované rekombinanty v obou orientacích byly izolovány a ověřeny. Plazmid CZ2-1 má EPO gen v orientaci „a“ (tj. 5' konec EPO nejbliže k SV40 počátku) a plazmid CZ1-3 je v opačné orientaci (orientace „b“).

30 Plazmidy CZ1-3 a CZ2-1 byly transfektovány do COS-1 buněk, jak je popsáno v příkladu 7, a média byla sklizena a zkoušena na imunologicky reaktivní EPO. Přibližně 31 ng/ml EPO bylo defektních v supernatantu kultury z CZ2-1 a 16-31 ng/ml CZ1-3.

Genomické klony HEPO1, HEPO2 a HEPO5 mohou být inzertovány do COS buněk pro expresi podobným způsobem.

## 35 Příklad 13

## Expres v C127 a v 3T3 buňkách. Konstrukce pBPVEPO

40 Plazmid, obsahující EPO cDNA sekvenci pod transkripční kontrolou myšního metalothioneinového promotoru a napojený ke kompletní DNA hovézího papillona viru, byl připraven následovně:

## pEPO49F

Plazmid SP6/5 byl získán od Promega Biotec. Tento plazmid byl štěpen kompletně pomocí EcoRI a 1340 bp EcoRI fragment z lambda-HEPOFL13 byl inzertován DNA ligázou. Výsledný plazmid, ve kterém 5' konec EPO genu byl nejbliže k SP6 promotoru (stanoveno pomocí štěpení BgII a Hind III), byl nazván pEPO49F. V této orientaci je BamHI místo v PSP6/5 polylinkeru přímo připojeno k 5' konci EPO genu.

## pMMTneo BPV

Plazmid pdBPV-MMTneo (342-12) (Law a spol., Mol. and Cell Biol., 3:2110-2115 (1983)), ilustrovaný na obr. 8, byl štěpen kompletně pomocí BamHI za vzniku dvou fragmentů – velkého fragmentu asi 8 kb v délce, obsahujícího BPV genom, a menšího fragmentu asi 6,5 kb délky, obsahujícího pML2 počátek replikace a gen ampicilinové rezistence, metallothioneinový promotor, gen rezistence neomycinu a SV40 polyadenylační signál. Štěpená DNA byla recirkularizována DNA ligázou a plazmidy, které obsahují pouze 6,8 kb fragment, byly identifikovány pomocí EcoRI a BamHI restričním endonukleázovým štěpením. Jeden z těchto plazmidů byl nazván pMMTneo BPV.

## pEPO15a

pMMT neo BPV byl kompletně štěpen pomocí BgIII. pEPO49f byl štěpen kompletně pomocí BamHI a BgIII a přibližně 700 bp fragment byl připraven izolací na gelu. BgIII štěpený pMMTneo BPV a 700 bp BamHI/BgIII Epo fragment byly ligovány a výsledné plazmidy, obsahující EPO cDNA, byly identifikovány koloniovou hybridizací s oligonukleotidovou d(GGTCATCTGTCCCCTGTCC) sondou, která je specifická pro EPO gen. Z plazmidů, které byly pozitivní při hybridizační analýze, byl jeden (pEPO15a), který měl EPO cDNA v orientaci takové, že 5' konec cDNA byl nejbližší metallothioneinovému promotoru, identifikován štěpením pomocí EcoRI a KpnI.

## pBPV-EPO

Plazmid pEPO15A byl štěpen kompletně BamHI pro linearizaci plazmidu. Plazmid pdBPV-MMTneo(342-12) byl také štěpen kompletně pomocí BamHI za vzniku dvou fragmentů 6,5 a 8 kb. 8 kb fragment, který obsahuje celý genom hovězího Papilloma viru, byl izolován na gelu. pEPO15a/BamHI a 8 kb BamHI fragment byly spolu ligovány a plazmid (pBPV-EPO), který obsahuje BPV fragment, byly identifikovány koloniovou hybridizací za použití oligonukleotidové sondy d(P-CCACACCCGGTACACA-OH), která je specifická pro BPV genom. Štěpení pBPV-EPO DNA pomocí Hind III indikuje, že směr transkripce BPV genomu byl stejný jako směr transkripce metallothioneinového promotoru (jako v pdBPV-MMTneo(342-12) viz obr. 8). Plazmid pdBPV-MMTneo(342-12) je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem č. ATCC 37224.

## Expresi

Následující metody byly použity pro expresi EPO.

## Metoda I

DNA pBPV-EPO byla připravena a přibližně 25 ug bylo použito k transfekování asi  $1 \times 10^6$  C127 (Lowy a spol., J. of Virol. 26:291-98 (1978)) CHO buněk za použití standardních technik srážení fosforečnanem vápenatým (Grahm a spol., Virology, 52:456-67 (1973)). Pět hodin po transfekci byla transfekční média odstraněna, buňky byly podrobeny glycerinovému šoku, promyty a bylo přidáno čerstvého  $\alpha$ -média, obsahujícího 10 % fetálního bovinního séra. Po 48 hodinách byly buňky trypsinizovány a štěpeny v poměru 1:10 v DME médiu, obsahujícím

500 ug/ml G418 (Southern a spol., Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982)), a buňky byly inkubovány dva až tři týdny. G418 rezistentní kolonie pak byly individuálně izolovány do mikrotitračních jamek a ponechány růst do stadia za přítomnosti G418. Buňky pak byly promyty, bylo přidáno čerstvé médium, obsahující 10 % fetálního hovězího séra a média byla sklizena o 48 hodin později. Kondicionované médium bylo testováno a zjištěno jako pozitivní při radioimunoeseji a in vitro biologické eseji.

Metoda II

C127 nebo 3T3 buňky se transfektovaly 25 ug pBPV-EPO a 2ug pSV2neo (Southern a spol., supra), jak je popsáno v metodě I. Je zde přibližně 10-násobný molární přebytek pBPV-EPO. Po transfekci je postup stejný jako v metodě 1.

Metoda III

C127 buňky byly transfektovány 30 ug pBPV-EPO, jak je popsáno v metodě I. Po transfekci a štěpení (1:10) bylo každé tři dny vyměňováno čerstvé médium. Po asi 2 týdnech byla zřejmá ložiska transformovaných buněk. Jednotlivá ložiska byla odebrána jednotlivě do 1cm jamek mikrotitrační plotny, ponechána růst do subsouvislé monovrstvy a zkoušena na EPO aktivitu nebo antigenicitu v kondicionovaném médiu.

Příklad 14

Expresse ve hmyzích buňkách. Konstrukce pIVEV EPOFL13

Plazmidový vektor pIVEV byl uložen a je dostupný od American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem č. ATCC 39991. Vektor byl modifikován následovně:

pIVEVNI

pIVEV byl štěpen pomocí EcoRI k linearizaci plazmidu, zatupen použitím velkého fragmentu DNA polymerázy I a jediného NotI linkeru

GGCGGCCGCC  
CCGCCGGCGG

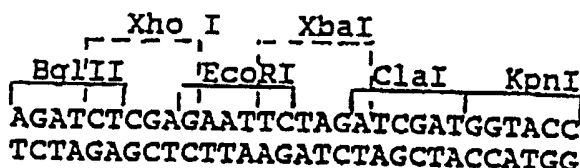
byl inzertován ligací k otupeným koncům. Výsledný plazmid je nazván pIVEVNI.  
pIVEVSI

pIVEV byl štěpen pomocí SmaI k linearizaci jediného SfiI linkeru

GGGCCCCAGGGGCC  
CCCGGGTCCCCGGG

byl inzertován ligací k otupeným koncům. Výsledný plazmid byl nazván pIVEVSI.  
pIVEVSI BgKp.

Plazmid pIVEVSI byl štěpen pomocí KpnI k linearizaci plazmidu a přibližně 0 až 100 bp bylo získáno z každého konce štěpením dvojřetězcovou exonukleázou Bal 31. Jakékoliv konce, které nebyly perfektně tupé, byly zatupeny pomocí velkého fragmentu DNA polymerázy I a polylinker



byl inzertován ligací k tupým koncům. Polylinker byl inzertován v obou orientacích. Plazmid, ve kterém je polylinker orientován tak, že BgIII místo v polylinkeru je nejbližší k promotoru polyhedron genu, je nazván pIVEVSIBgKp. Plazmid, ve kterém KpnI místo v polylinkeru je nejbližší k promotoru polyhedron genu, je nazván pIVEVSIKpBg. Počet párů bází, které byly deletovány mezi původním KpnI místem v pIVEVSI a polyhedron promotorem, nebyl stanoven. pIEIVSIBgKp byl uložen a je dostupný z American Type Culture Collection, Rockville, Maryland pod přírůstkovým číslem č. ATCC 399988.

#### 10 pIVEVSIBgKpN1

pIVEVNI byl štěpen kompletně pomocí KpnI a PstI za vzniku dvou fragmentů. Větší fragment, který obsahuje plazmidový počátek replikace a 3' konec polyhedron genu, byl připraven izolací na gelu (fragment A). pIVEVSIBgKp byl štěpen kompletně pomocí pstI a Kpn za vzniku dvou fragmentů a menší fragment, který obsahuje polyhedron genový promotor a polylinker, byl připraven izolací na gelu (fragment B). Fragment A a B pak byly spojeny DNA ligázou za vzniku nového plazmidu pIVEVSIBgKpN1, který obsahuje částečně deletovaný polyhedron gen, do kterého byl inzertován polylinker, a obsahuje také NotI místo (nahrazení zničeného EcoRI místa) a SfiI místo, které přiléhá k polyhedron genové oblasti.

20

#### pIVEPO

pIVEVSI BGKpN1 byl štěpen kompletně pomocí EcoRI pro linearizaci plazmidu a 1340 bp EcoRI fragment z lambda-HEPOFL13 byl inzertován. Plazmidy, obsahující EPO gen v orientaci takové, že 5' konec EPO genu je nejbližší polyhedron promotoru a 3' konec polyhedronu genu, byly identifikovány štěpením s BgIII. Jeden z těchto plazmidů ve výše popsané orientaci byl označen pIVEPO.

25

#### Expres EPO ve hmyzích buňkách

30

Velká množství pIVEPO plazmidu byla vyrobena transformací E.coli kmene JM101-tgI. Plazmidová DNA byla izolována technikou čištění lyzátu (Maniatis a Fritsch, Cold Spring Harbor Manual) a dále čištěna pomocí CsCl odstředění. L-1 DNA polyhedrosis viru standardního typu Autographa californica (AcNPV) byla připravena fenolovou extrakcí částic viru a následným CsCl čištěním virové DNA.

35

Tyto dvě DNA pak byly kotransfektovány do Spodoptera frugiperda buněk IPLB-SF-21 (Vaughn a spol., In Vitro, díl B, str. 213-17 (1977) za použití transfekčního postupu s fosforečnanem vápenatým (Potter a Millere, 1977). Pro každou plotnu kotransfektovaných buněk byl použit 1 ug DNA standardního typu AcNPV a 10 ug pIVEPO. Plotny byly inkubovány při 27 °C 5 dnů. Supernatant pak byl oddělen a EPO exprese v supernatantu byla potvrzena radioimunoesejí a in vitro biologickou esejí.

40

#### 45 Příklad 15

##### Čištění EPO

COS-buněčná kondicionovaná média (121) s EPO koncentracemi až 200 ug/litr byla koncentrována na 600 ml za použití ultrafialových membrán se schopností dělení 10 000 mol. hmotnosti, jako je Millipore Pellicans 0,46 m<sup>2</sup> na membránu. Eseje byly provedeny pomocí RIA, jak je popsáno v příkladu 6. Retentát z ultrafiltrace byl diafiltrován proti 4 ml 10 mM 10 mM fosforečnanu sodného, pufovaného na pH 7,0. Koncentrovaná a diafiltrovaná kondiční média obsahují 2,5 mg EPO ve 380 mg celkového proteinu. EPO roztok byl dále koncentrován na 186 ml a vysrážené proteiny byly odstraněny odstředěním při 110 000 x g po 30 minut.

55

Supernatant, který obsahuje EPO (2,0 mg), byl upraven na pH 5,5 s 50% kyselinou octovou, ponechán míchat při 4 °C 30 minut a sraženina byla odstraněna odstředováním při 13 000 x g po 30 minut.

5 Chromatografie na karbonylmethylsepharose

Supernatant z odstředování (20 ml), obsahující 200 ug EPO (24 mg celkového proteinu), byl nanesen na kolonu, naplněnou CM-Sepharosovou (20 ml), ekvilibrovanou v 10 mM octanu sodného pH 5,5, promytou 40 ml stejného pufru. EPO, který se navázal k CM-Sepharose, byl eluován 100 ml gradientu NaU (0–1) v 10 mM fosforečnanu sodném pH 5,5. Frakce, obsahující EPO (celkem 50 ug ve 2 mg celkových proteinů), byly spojeny a koncentrovány na 2 ml za použití Amicon YM10 ultrafiltrační membrány.

HPLC s reverzní fází

15 Koncentrované frakce z CM-Sepharosy, obsahující EPO, byly dále čištěny pomocí HPLC s reverzní fází za použití Vydac-4 kolony. EPO byl nanesen na kolonu, ekvilibrovanou v 10% rozpouštědle B (rozpouštědlo A bylo 0,1 %  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  ve vodě; rozpouštědlo B bylo 0,1 %  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  v  $\text{CF}_3\text{CN}$ ) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Kolona byla promývána 10% B po 10 minut a EPO byl eluován s lineárním gradientem B (10–70 % po 60 minut). Frakce, obsahující EPO, byly spojeny (asi 40 ug EPO ve 120 ug celkových proteinů) a lyofilizovány. Lyofilizovaný EPO byl rekonstituován v 0,1M Tris HCl při pH 7,5, obsahujícím 0,15M NaCl a rechromatografován pomocí HPLC s reverzní fází. Frakce, obsahující EPO, byly spojeny a analyzovány SDS-polyakrylamidovou (10%) gelovou elektroforézou (Lameli U.K., Nature).  
25 Spojené frakce EPO obsahují 15,5 ug EPO ve 25 ug celkového proteinu.

- 1) Jacobson, L. O., Goldwasser, E. Fried, W., a Plzak, L. F., Trans. Assoc. Am. Physicians TO:305-317 (1957).
- 2) Krantz, S. B. a Jacobson, L. O. Chicago: University of Chicago Press 1970, pp. 29-31.
- 3) Hammond, D a Winnick, S. Ann. N.Y. Acad. Sci. 230:219-227 (1974).
- 4) Sherwood, J. B. ε Goldwasser, E., Endocrinology 103:866-870 (1978).
- 5) Fried, W. Blood 40:671-677 (1972).
- 6) Fisher, J. J. Lab. ar Clin. Med. 93:695-699 (1979).
- 7) Naughton, B. A., Kaplan, S. M., Roy, M., Burdowski, A. J., Gordon, A. S., a Piliero, S. J. Science 196:301-302.
- 8) Lucarelli, G. P., Howard, D., a. Stohlman, F., Jr. J. Clin. Invest 43:2195-2203 (1964).
- 9) Zanjani, E. D., Poster, J., Burlington, H., Mann, L. I., a Wasserman, L. R. J. Lab. Clin. Med. 89:640-644 (1977).
- 10) Krantz, S. B., Gallien-Lartigue, O., a Goldwasser, E. J. Biol. Chem. 238:4085-4090 (1963).
- 11) Dunn, C. D., Jarvis, J. H. a Greenman, J. M. Exp. Hematol. 3:65-78 (1975).
- 12) Krystal, G. Exp. Hematol. 11:649-660 (1983)
- 13) Iscove, N.N. a Guilbert, L.J., M.J. Murphy, Jr. (Ed.) New York: Springer-Verlag, pp. 3-7 (1978).
- 14) Goldwasser, E., ICN UCLA Symposium Control of Cellular Division and Development, A. R. Liss, Inc., pp. 487-494 (1981)
- 15) Cline, M. J. a Golde, D. W. Nature 277:177-181 (1979)
- 16) Metcalf, D., Johnson, G. R., a Burgess, A. W. Blood 55:138- (1980)
- 17) Krane, N. Henry Ford Hosp. Med. J. 31:177-181 (1983)
- 18) Eschbach, J., Madenovic, J., Garcia, J., Wahl, P., a Adamson, J. J. Clin. Invest. 74:434-441 (1984)
- 19) Anagnostou, A., Barone, J., Vedo, A., a Fried, W. Br. J. Hematol 37:85-91 (1977)
- 20) Miyake, T., Kung, C., a Goldwasser, E. J. Biol. Chem. 252:5558-5564 (1977)
- 21) Yanagawa, S., Hirade, K., Ohnota, H., Sasaki, R., Chiba, H., Veda, M., a Goto, M. J. Biol. Chem. 259:2707-2710 (1984)
- 22) Lawn, R. M., Fritsch, E. F., Parker, R. C., Blake, G., a Maniatis, T. Cell 15:1157 - (1978)
- 23) Sanger, F., Nicklen, S., a Coulson, A. R. Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 74:5463- (1977)
- 24) Zanjanc, E.D., Ascensao, J.L., McGlave, P.B., Barisadre, M., a Ash, R. C. J. Clin. Invest. 67:1183- (1981)
- 25) Toole, J.J., Knopf, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A. Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J.,

- Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N., a. Hewick, R. M. Nature in Press
- 26) Goldwasser, E. Blood Suppl. 1, 58, xlii (abstr) (1981)
- 27) Sue, J. M. a. Sytkowdki, A. J. Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 80:3651-3655 (1983)
- 29) Bersch, N. a. Golde, D.W., In Vitro Aspects of Erythropoiesis, M. J. Murphy (Ed.) New York: Springer-Verlag (1978)
- 30) Cotes, P. M. a. Bangham, D. R. Nature 191:1065- (1961)
- 31) Goldwasser, E. a. Gross, M. Methods in Enzymol 37:109-121 (1975)
- 32) Nabeshima, Y. -i, Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., a. Ogata, K. Nature 308:333-338 (1984)
- 33) Young, R. A., Hagencuhle, O. a. Schibler, U. Cell 23:451-558 (1981)
- 34) Medford, R. M., Nguyen, H. T., Destree, A. T., Summers, E. a. Nadal-Ginard, B. Cell 38:409-421 (1984)
- 35) Ziff, E. B. Nature 287:491-499 (1980)
- 36) Early, P. Cell 20:313-319 (1980)
- 37) Sytkowski, A. Bio. Biop. Res. Comm. 96:143-149 (1980)
- 38) Murphy, M. a. Miyake, T. Acta. Haematol. Jpn. 46:1380-1396 (1983)
- 39) Wagh, P. V. a. Bahl, O. P. CRC Critical Reviews in Biochemistry 307-377 (1981)
- 40) Wang, F. F., Kung, C. K. -H. a. Goldwasser, E. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 42:1872 (abstr) (1983)
- 41) Lowy, P., Keighley, G. a. Borsook, H. Nature 185:102-103 (1960)
- 42) VanLenten, L. a. Ashwell, G. J. Biol. Chem. 247:4633-4640 (1972)
- 43) Lee-Huang, S. Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 81:2708-2712 (1984)
- 44) Fyhrquist, F., Rosenlof, K., Gronhagen-Riska, C., Hortling, L. a. Tikkanen, I. Nature 308:649-562 (1984)
- 45) Ohkubo, H., Kageyama, R., Vjihara, M., Hirose, T., Inayama, S., a. Nakanishi, S. Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 80:2196-2200 (1983)
- 46) Suggs, S.V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H. a. Itakura, K. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. -78:6613-6617 (1981)
- 47) Woo, S. L. C., Dugaiczky, A., Tsai, M. -J., Lai, E. C., Catterall, J. F. a. O'Malley, B. W. Proc. Nat'l.-Acad. Sci. U.S.A. 75:3688- (1978)
- 48) Melchior, W. B. a. VonHippel, P. H. Proc. Nat'l Acad. Soc. U.S.A. 70:298-302 (1973)
- 49) Orosz, J. M. a. Wettnis, J. G. Biopolymers 16:1183-1199 (1977)
- 50) Anderson, S a. Kingston, I. B. Proc. Nat'l Acad. Sci.-U.S.A. 80:6836-6842 (1983)
- 51) Ullrich, A., Coussens, L., Haylick, J. S. Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, H., Waterfield, M.D. a. Seeburg, P. H. Nature 309: 418-425 (1984)
- 52) Fisher, J. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 173:289-305 (1983)
- 53) Kozak, M. Nuc. Acid Res. 12:857-872 (1984)
- 54) Benton, W.D. a. Davis, R.W. Science 196:180-182 (1977)
- 55) Sherwood, J.B. a. Goldwasser, E. Blood 54:885-893 (1979)
- 56) Derman, E., Krauter, K., Walling, L., Weinberger, C., Ray, M., a. Darnell, J. T., Cell 23:731- (1981)
- 57) Gluzman, Y., Cell 23:175-182 (1981)
- 58) Hewick, R. M., Hunkapiller, M. E., Hood, L. E., a. Dreyer, W. J. J. Biol. Chem. 256:7990-7997 (1981)
- 59) Towbin, H., Stachelin, T., a. Gordon, J., Proc. Nat'l Acad. Sci. 76:4380- (1979)
- 60) Carnott, P., Deflandre, C. C. R. Acad. Sci. Paris 143:432-(1960)

5

## PATENTOVÉ NÁROKY

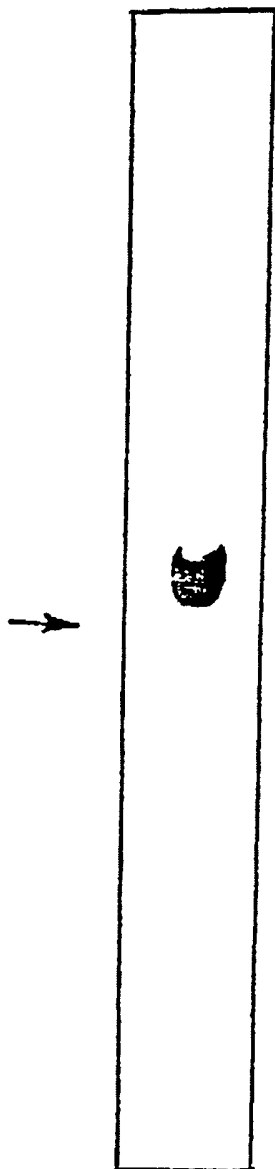
1. Způsob produkce lidského erythropoietinu, vyznačující se tím, že se ve vhodném médiu kultivují eukaryontní hostitelské buňky, obsahující DNA sekvenci, znázorněnou v tabulce 3 od sekvence ATG kódující počáteční Met do AGA kódující terminální Arg, operativně připojenou k expresní kontrolní sekvenci, a takto vyrobený erythropoietin se oddělí od buněk a média.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje fetální sérum.
- 5 3. Způsob podle některého z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že hostitelské buňky jsou savčí buňky.
- 10 4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že savčí buňky jsou buňky CV<sub>1</sub> Origin SV 40 (COS), buňky vaječnicků čínské křečka (CHO), buňky myší buněčné linie, pocházející z tkáně mléčné žlázy (C127), nebo buňky myší buněčné linie, pocházející z tkáně epithelu (3T3).
- 15 5. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že savčí buňky jsou buňky 3T3.
6. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že savčí buňky jsou buňky CHO.
7. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že DNA sekvence je obsažena ve vektoru, který také obsahuje DNA hovězího papilomaviru.

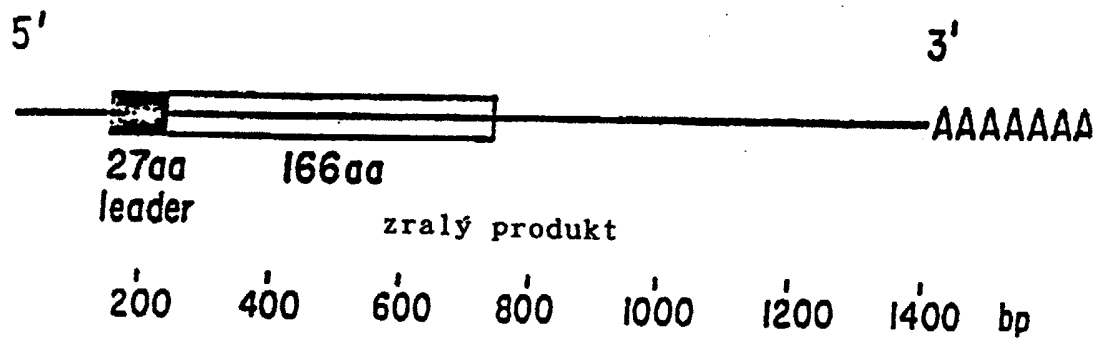
20

10 výkresů

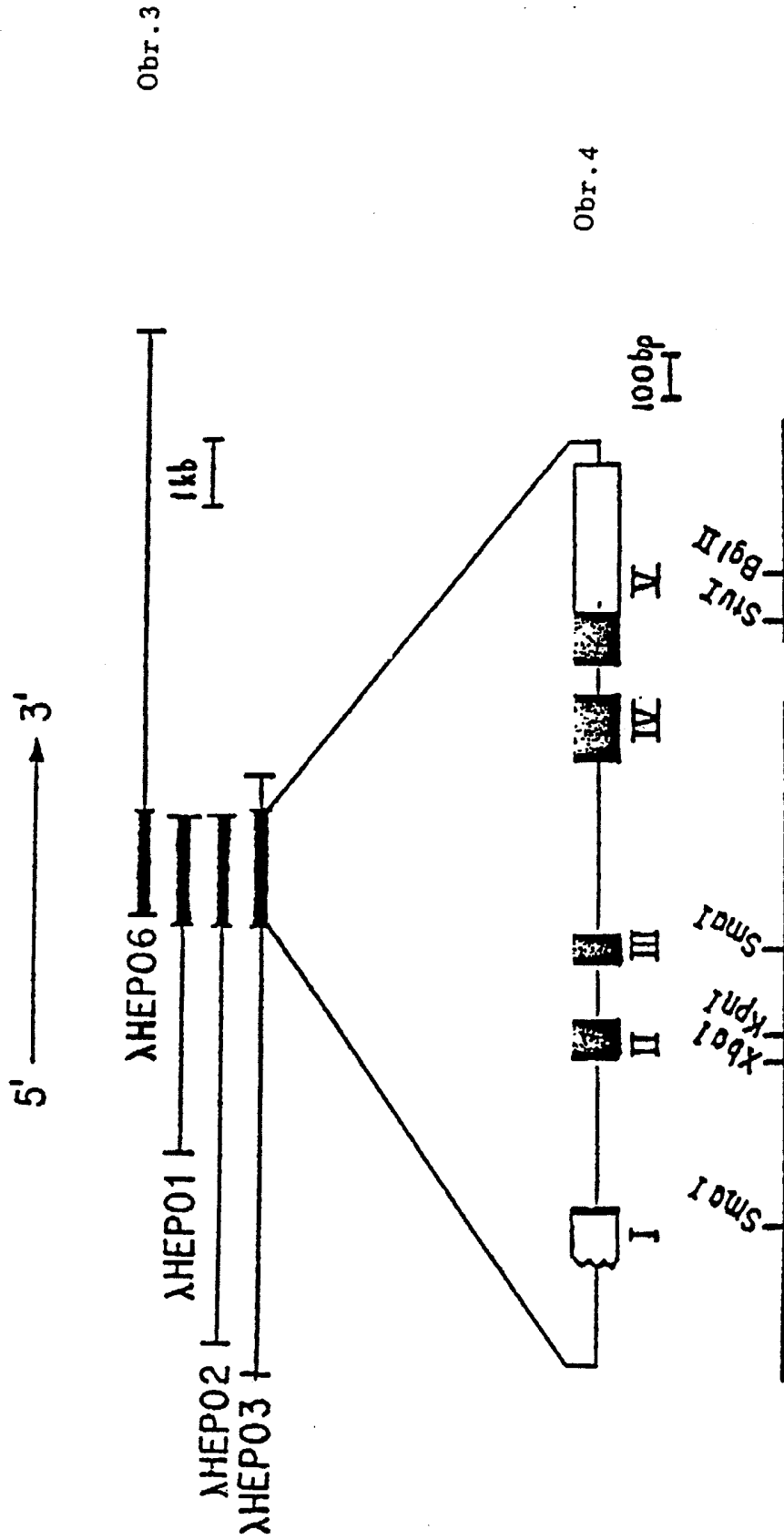
Játra dospělé  
játra fetu

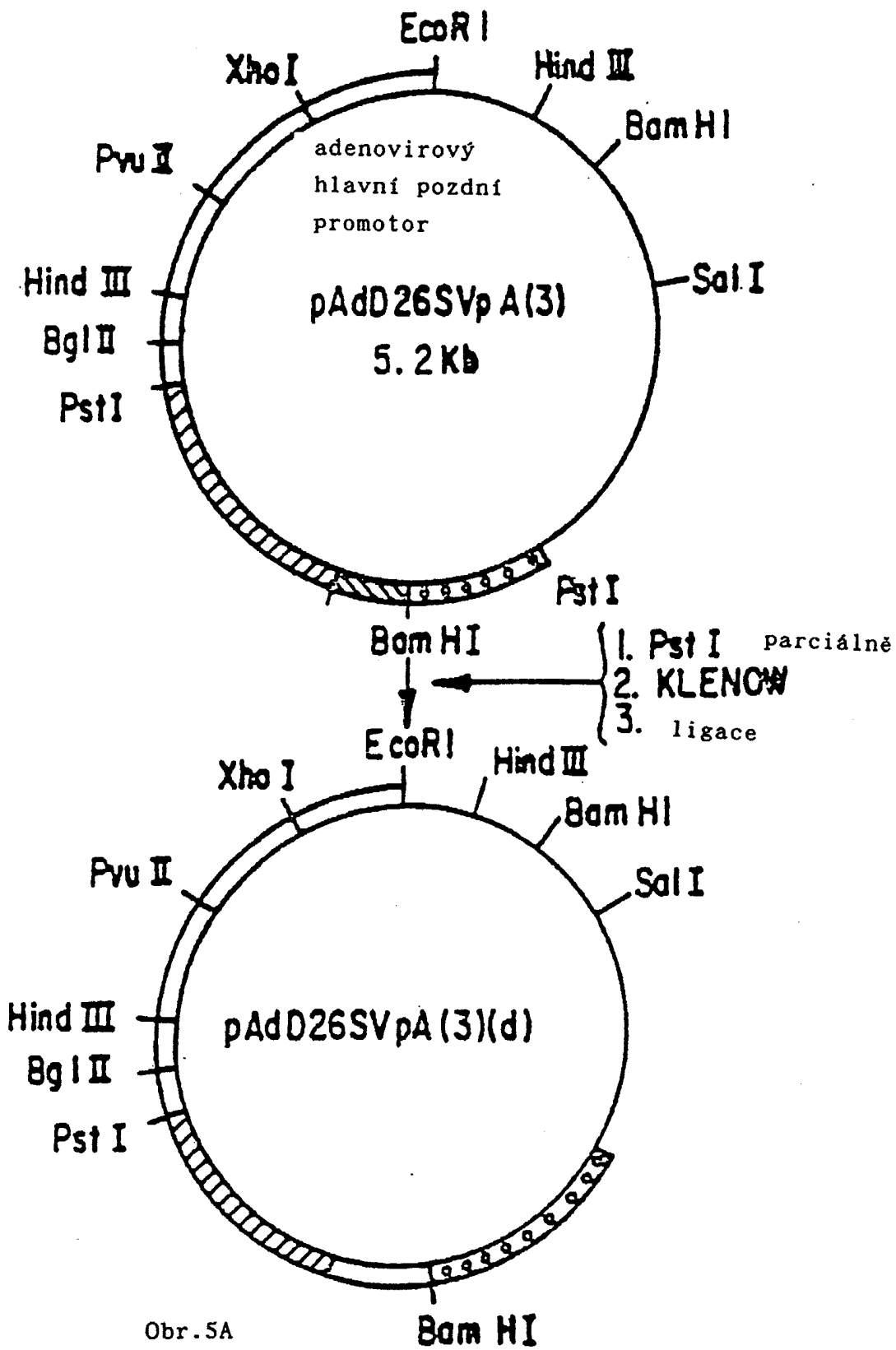


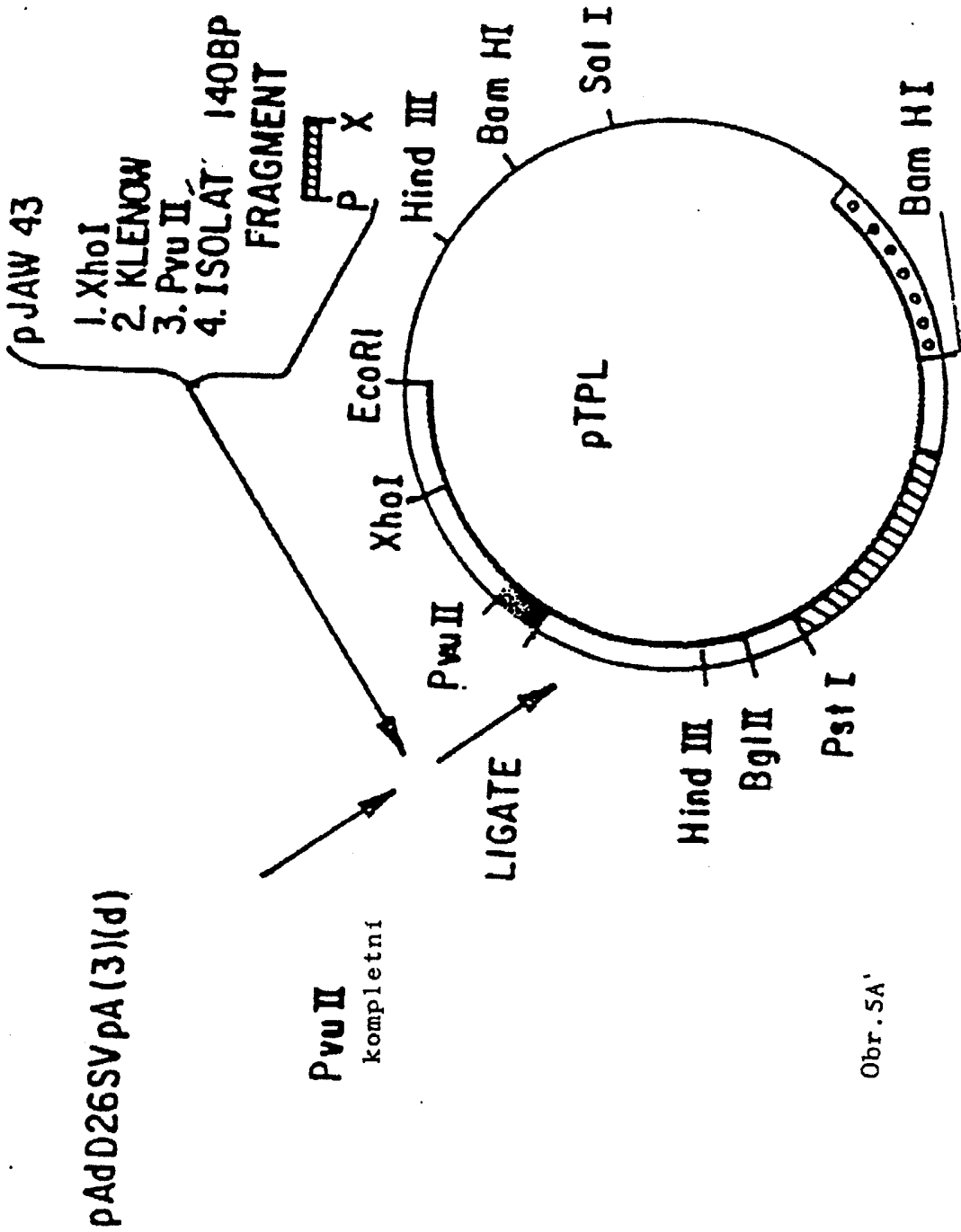
Obr. 1



Obr. 2

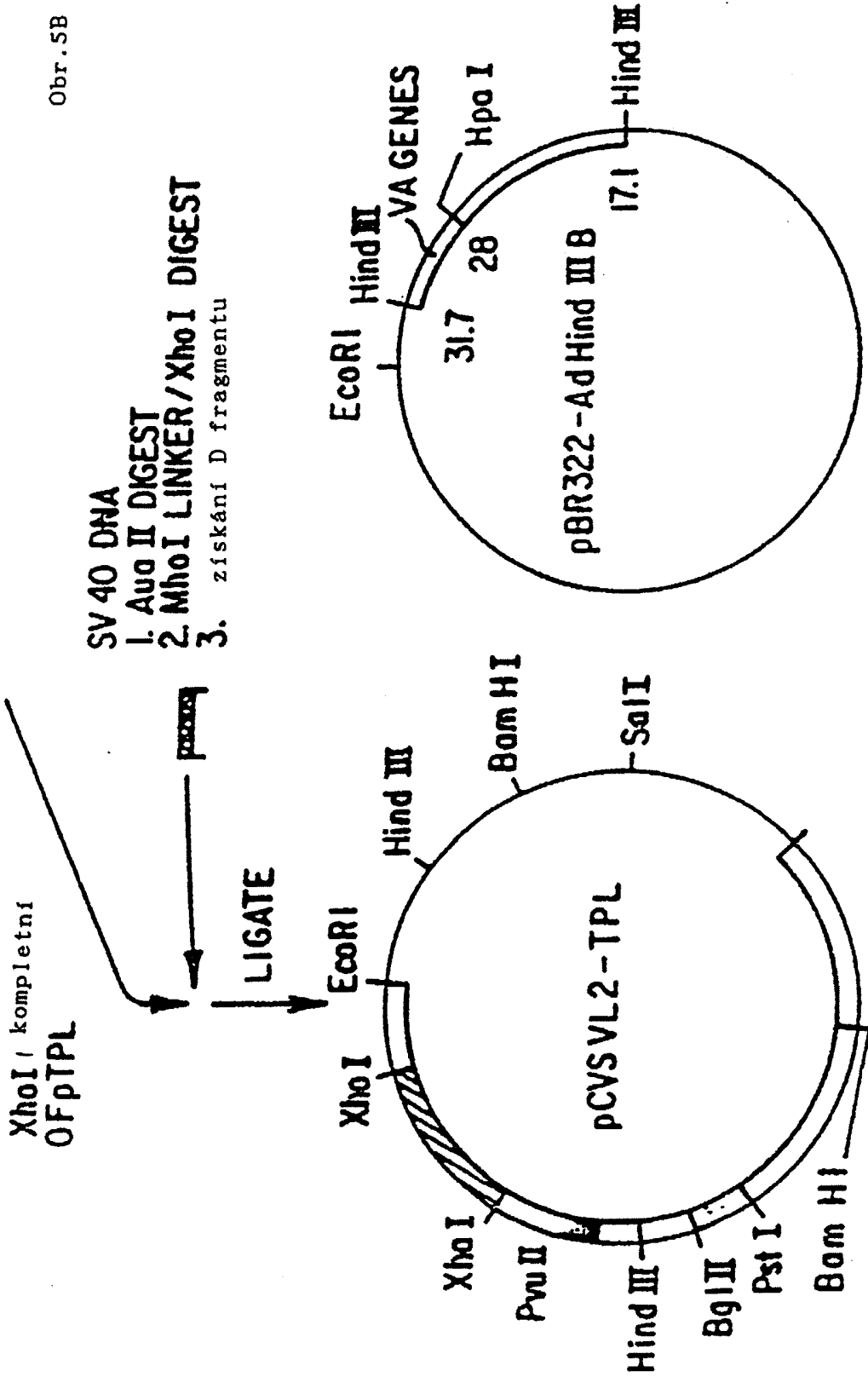


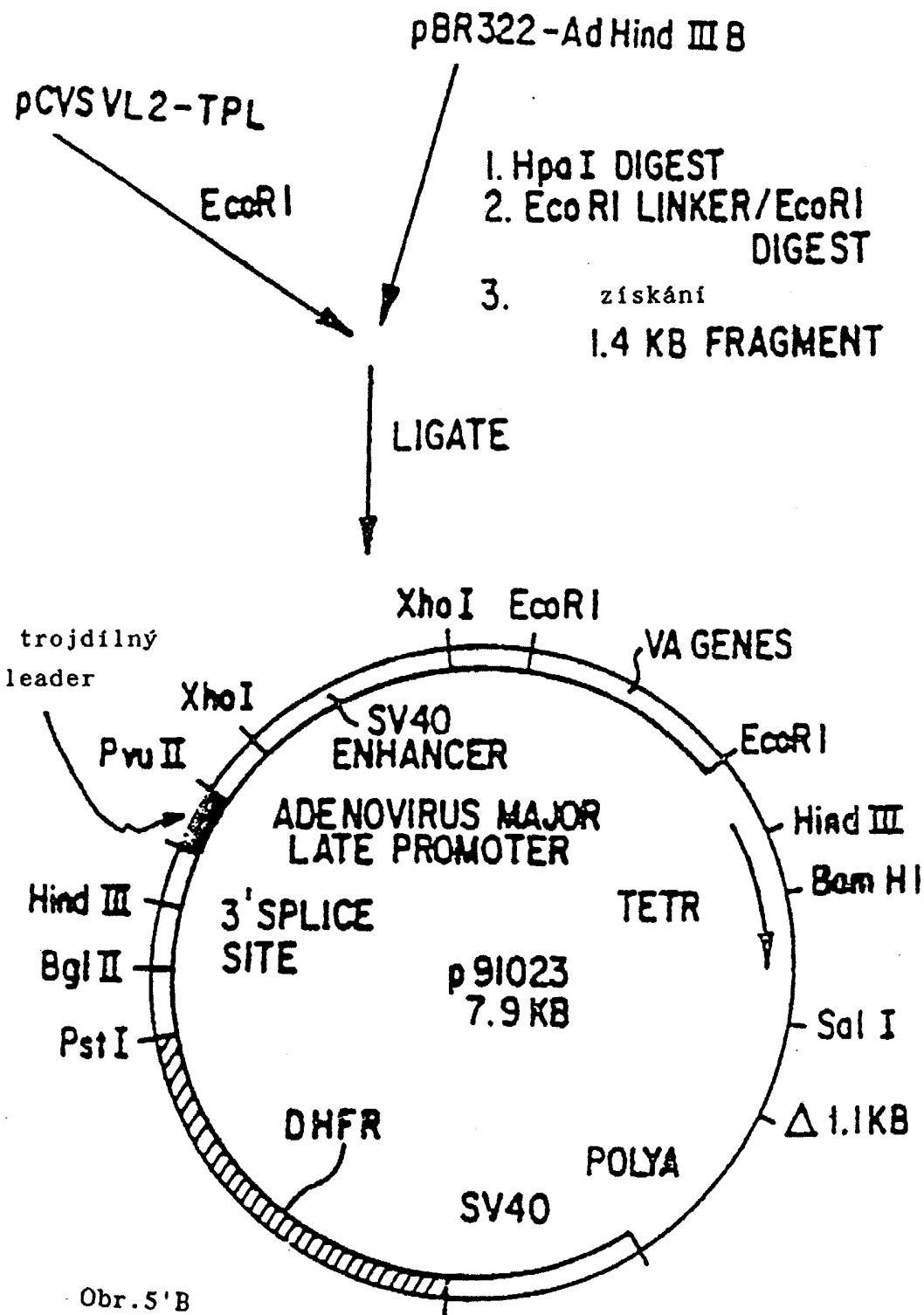


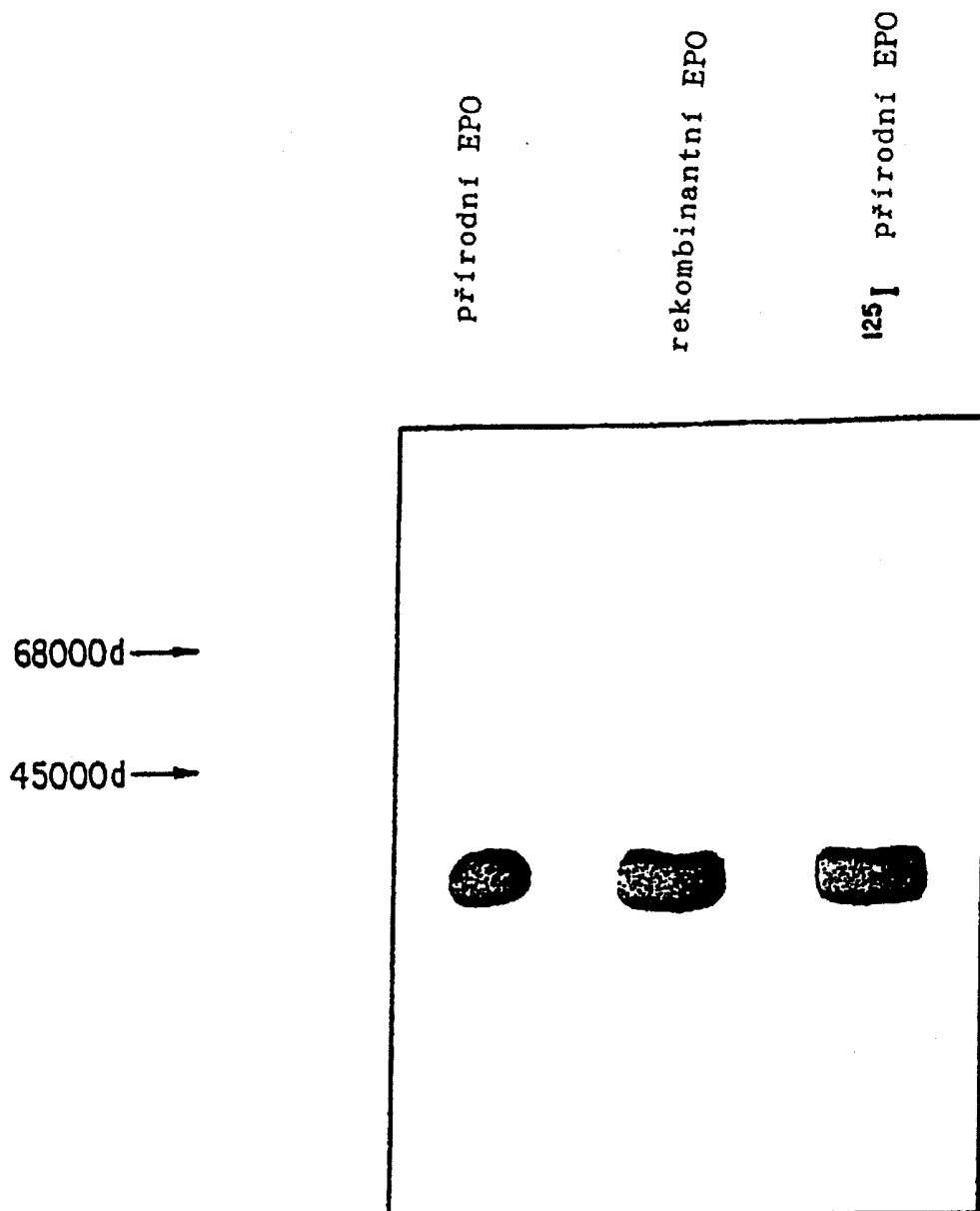


Obr. 5A'

Obr. 5B

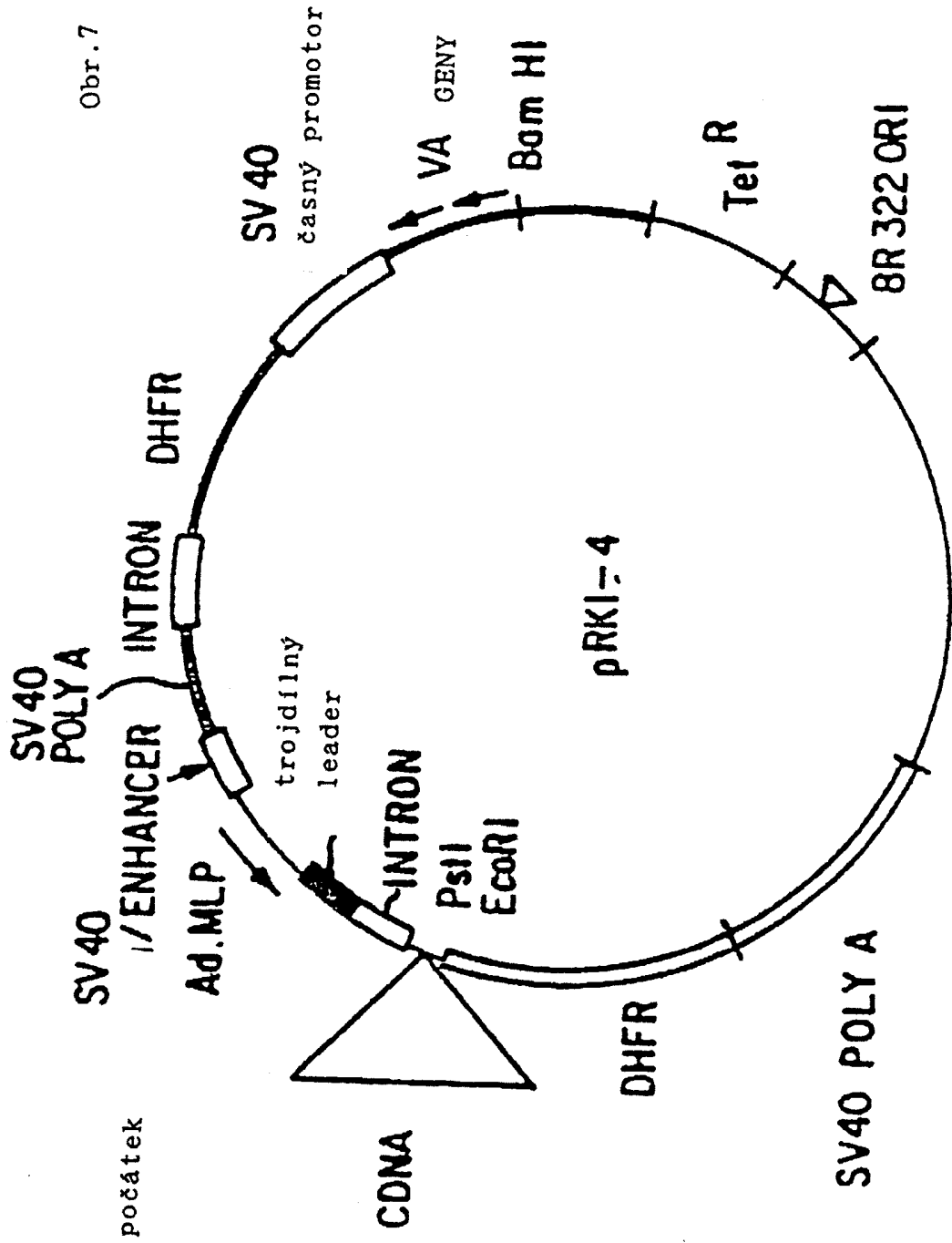




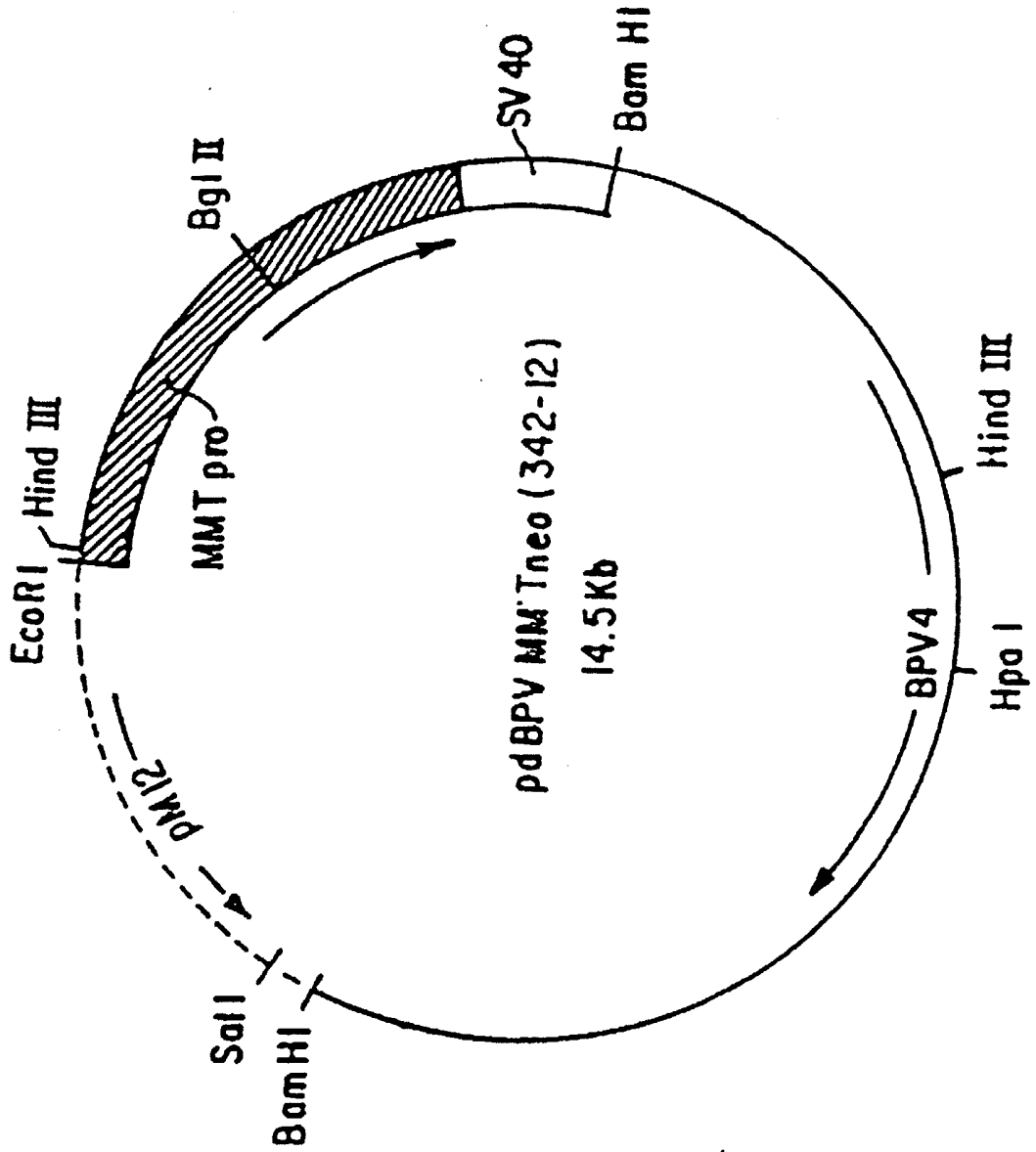


Obr. 6

Obr. 7



Obr. 8



Konec dokumentu