FI0000953938

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 95393

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 01 199 C

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 12N 15/12, 5/10, C 07K 14/505, C 12P 21/02

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 880899

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 26.02.88

(24) Alkupäivä - Löpdag 23.06.87

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 26.02.88

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 13.10.95

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/US87/01459

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

27.06.86 US 879423 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Board of Regents of the University of Washington**, 201 Administration Building, The Graduate School AG-10, Seattle, WA 98195, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Powell, Jerry S.**, 3887 - 44th Avenue Northeast, Seattle, WA 98195, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: **Leitzinger Oy**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Oleellisesti puhdas DNA ja RNA ja menetelmä erytropoietiinin ekspressoimiseksi
Väsentligen rent DNA och RNA och förfarande för expression av erytropoietin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 148605 (C 12N 15/00), WO A 85/03079 (C 12N 15/00), WO A 86/03520 (C 12P 21/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Ihmisen erytropoietiinigeenin Apa I-restriktiopala, jonka avulla tuotetaan korkeita tiittereitä biologisesti aktiivista hormoonia stabiilisti transfektoiduista solulinjoista.

Apa I-restriktionsfragment av human-erytropoietingenen, med vars tillhjälp produceras höga titer av en biologiskt aktiv hormon från stabilt transfekterade cellinjer.

Oleellisesti puhdas DNA ja RNA ja menetelmä erytropoietiinin ekspressoimiseksi - Väsentligen rent DNA eller RNA och förfarande för expression av erytropoietin

Tämä keksintö tehtiin osittain hallituksen tuella National Institutes of Health-instituutin myöntämällä tutkimusmäärärahoilla HL 16919, AM 19410, AM 01418 ja CA 31615. Hallituksella on määrätyt oikeudet tähän keksintöön.

Tämän keksinnön kohteena on yleisesti geneettinen manipulointi, erityisesti rekombinantti-geenien glykoproteiinituotteiden ekspressoiminen ja tarkemmin sanoen biologisesti aktiivisen ihmisertyropoeitiinin suurten määrien ekspressointi stabiilisti transfektoiduissa soluissa.

Erytropoietiin-hormoonilla on tärkeä osuus erytropoieesin säätelyssä eli punaisten verisolujen muodostumisen säätelyssä, ja erytropoietiinin puutostilat johtavat anemiaan. Yksityiskohtaiset hormonin tutkimukset ja yritykset löytää korvaava hoitokeino ovat olleet vaikeita johtuen puhdistetun materiaalin niukkuudesta.

Ihmisen punaisten verisolujen normaalin tuoton edellytyksenä on, että munuainen erittää erytropoietiinia, ilmeisestikin valmiina glykoproteiinina. Tätä hormonia kiertää vakiotilassa veressä konsentraatiossa 10 - 18 milliyksikköä (128-230 pikogrammaa) millilitrassa, ja nämä määrät voivat nousta jopa 1000-kertaisesti, kun kiihotetaan voimakkaan kudoshypoksian (hapenpuute) avulla. Kohonnut hormonitaso käynnistää reseptiivisten verisolujen populaation lisääntymisen ja erikoistumisen luuytimessä, kiihottaa hemoglobiinin synteesiä kypsyvissä erytroidisoluissa ja nopeuttaa punaisten verisolujen vapautumista luuytimestä verenkiertoon ja näin lisää punaisten verisolujen massaa ja lievittää hypoksiatiloja. Potilaat, jotka kärsivät erytropoietiinin puutostiloista, kuten potilaat, joilla on krooninen munuaisen toimintavajavuus, kärsivät usein vaikeasta anemiasta.

Erytropoietiini on 34 - 38 kd glykoproteiini, jonka molekyylipainosta noin 40 % muodostuu hiilihydraatista. Aktiivisuus edellyttää vähintään yhtä disulfidisiltaa. Tämän hormonin rakenteesta tiedetään vain vähän eikä sen synteesin yksityiskohtia tunneta kovin hyvin. Viimeaikaiset cDNA- ja genomikloonien eristämiset antavat mahdollisuuden analysoida erytropoietiinin tuoton säätelyä, mutta biologisesti aktiivista ihmiserytropoieteenia ei ole kyetty ekspressoimaan niin paljon, että se riittäisi korvausterapiaan.

Tämän kuvauksen perusteella voidaan ekspressoida biologisesti aktiivista ihmiserytropoietiinia suuret määrät (nimellistiiteri yli kaksi miljoonaa yksikköä supernatanttilitraa kohti) stabiilisti transfektoiduista nisäkässolulinjoista. Kliinisiä sovellutuksia varten on siten olemassa puhdistetun ihmiserytropietiinin riittävä lähde. Erytropoietiini saadaan yllättäen ekspressoitumaan voimakkaasti transfektoimalla isäntäsolulinjat ihmisen erytropoietiinigeenin Apa I-restriktiopalalla. Apa I-restriktiopalan sensejuosteella on kuviossa 1 esitettyä sekvenssiä vastaava nukleotidisekvenssi.

Kuvio 1 esittää kaaviollisesti kohteena olevaa 2426 bp Apa I-restriktiopalaa, joka sisältää ihmisen erytropoietiinigeenin sekvenssit.

Kuvio 2 kuvaa tyypillistä plasmidi-ekspressiovektoria (pD11-Ep), joka sisältää 2426 bp Apa I-restriktiofragmentin.

Kuvio 3 kuvaa toista ekspressiovektoria (pBD-EP), jossa on kohteena oleva Apa I-restriktiopala.

Parhaana pidetyssä suoritusmuodossa kuviossa 1 esitetty, geneettisesti rakennettu Apa I-restriktiofragmentti insertoidaan nisäkäs-ekspressiovektoriin, kuten kuvioissa 2 ja 3 esitettyihin vektoreihin ja viedään nisäkässolulinjoihin tarkoituksella kehittää stabiilisti transfektoituja soluja,

jotka tuottavat suuria määriä biologisesti aktiivista ihmis-erytropoietiinia. ihmisen erytropoietiini-geenin Apa I-restriktiopala valittiin, jotta voitaisiin saada aikaan mahdollisimman tehokas erytropoietiini-lähetti-RNA:n transkriptio ja RNA:n mahdollisimman tehokas translaatio ja translaation jälkeinen modifiointi valmiiksi, biologisesti aktiiviseksi erytropoietiini-glykoproteiiniksi. Tarkemmin sanoen oli tärkeää poistaa etyropoietiini-geenin 5'-päästä häiritsevät sekvenssit, mutta samalla säilyttää lisäävät sekvenssit Apa I-restriktiopalassa säilytettiin intronit, jotta potentiaalisesti merkitsevästi parantavat sekvenssit jäisivät mukaan. Geenin 3'-päähän jätettiin jäljelle joitakin 3'-translatoimattomia sekvenssejä, jotta optimoitaisiin oletetut säätelysekvenssit. Apa I-palan avulla saadusta kohonneesta ekspressiosta on osoituksena yhdenmukaisesti korkeat erytropoietiinin ilmentymistasot, joita on kuvattu seuraavissa työesimerkeissä, kun tätä palaa käytettiin yhdessä kahden promoottorin ja kahden solulinjan kanssa.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on havainnollistaa esillä olevan keksinnön etuja ja auttaa taidoltaan normaalia henkilöä niiden toteuttamisessa ja käyttämisessä. Näiden esimerkkien tarkoituksena ei ole millään muulla tavoin rajoittaa tämän kuvauksen piiriä tai patentin antamaa suojaa.

ESIMERKKI 1

Genomikloonien eristäminen

Ihmisen genomikirjasto lambda-bakteerifaagissa (Cell 15:1157-1174, 1978) seulottiin käyttämällä alhaisen stringenttiyden hybridisointiolosuhteita ja oligonukleotidikoettimien seoksia, kuten on kuvattu tässä yhteydessä viitteenä mainitussa julkaisussa, Cell 38:287-297, 1984.

Oligonukleotidiseokset valmistettiin käyttämällä Applied Biosystems-syntetisointilaitetta ja pääte leimattiin käyttä-

mällä ^{32}p-ATP ja T4 polynukleotidikinaasia. Synteettiset oligonukleotidit suunniteltiin vastaamaan osia amino-terminaalisesta aminohapposekvenssistä:

H_2N-Ala-Pro-?-Arg-Leu-Ile-Leu-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-
Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-?-Ile-Thr-Asp-Gly-Gly-Ala
24

jonka Yanagawa et al. (J.Biol.Chem. 259:2707-2710, 1984) selvittivät ihmisproteiinille, joka oli puhdistettu aplastisesta anemiasta kärsivien potilaiden virtsasta. Tämän alueen aminohapposekvenssin kodonien degeneroitumisen pienentämiseksi käytettiin Grantham'in et al. (Nucleic Acids Research 8:43-59, 1981) ja Jaye et al. (Nucleic Acids Research 11:2325-2335, 1983) kodonin käyttösääntöjä. Nämä säännöt ottavat huomioon CpG-dinukleotidin suhteellisen harvinaisen esiintymisen selkärankaisten DNA:ssa ja välttävät kyseeseen tulevassa kohdassa potentiaalisen virheellisen parinmuodostuksen A:G. Aminohappoasemaan 24 korvattiin asparagiini kaikkein todennäköisimpänä aminohappona (J.Biol.Chem. 259:2707-2710, 1984). Aminohappoja Gly-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn varten syntetisoitiin ennustettuja kodoneja vastaamaan kaksi poolia, joissa kummassakin oli 72 sekvenssiä. Toinen pooli oli siten TT(c/t)TC(a/g/t)GC(c/t)TC(c/t)TT(a/g/t)GCTTC 20 nukleotidin koettimelle ja toisessa poolissa T oli korvattu C:lla asemassa 18. Aminohappoja Glu-Asn-Ile-Thr-Asp-Gly varten rakennettiin yksi sekvenssipooli (AGC TCC TCC ATC AGT ATT ATT T/c/t/) 23 nukleotidin koetinta varten.

Plakit, jotka hybridisoituivat oligonukleotidikoettimien kanssa, seulottiin uudelleen alhaisemmalla tiheydellä, kunnes ne olivat puhtaita. Sen jälkeen, kun alussa positiiviset faagikloonit plakki-puhdistettiin Jacobs et al. (Nature 313:806-310, 1985) julkaisi lisää sekvenssi-informaatiota erytropoietiini-geenistä. Tämän informaation perusteella rakennettiin oligonukleotidejä, joita käytettiin vahvistamaan positiivisten kloonien identtisyys. Sen jälkeen, kun positiiviset kloonit oli pilkottu Eco RI-restriktioentsyymil-

lä insertti-DNA-geeli puhdistettiin ja liitettiin standardimenetelmillä pUC 13-plasmidiin, joka jo oli restriktiopilkottu Eco RI:llä. DNA-sekvenssi määritettiin dideoksinukleotidi-ketjunpäättämismenetelmällä (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467, 1977) käyttämällä dATP (α-^{35}S):a ja 17-mer yleisprimeeriä tai käyttämällä valituilla alueilla spesifisiä oligonukleotidiprimeerejä. ^{32}p-ATP saatiin ICN:sta; entsyymit saatiin New England Biolabs tai Bethesda Research Laboratories-laitoksesta.

Noin 4,8 x 10^6 bakteerifaagia seulottiin hybridisoimalla nitroselluloosasuodatin-kopiot. Plakkipuhdistuksen läpi pysyi positiivisina kolme eri kloonia. DNA-insertti karakterisoitiin restriktiokartoittamalla ja osittaisen dideoksinukleotidisekvenssoinnin avulla. Näistä kolmesta kloonista näytti kaksi kloonia sisältävän täydellisen informaation erytropoietiinigeenilla. Kuviossa 1 on esitetty restriktiokartta ja -sekvenssi näiden kloonien 2426 bp Apa I-palalle. Se oli oleellisesti sama kuin minkä Jacobs et al. (Nature 313:806, 1985) äskettäin julkaisi ihmiserytropoietiinin geenille. Erytropoietiinigeenin sisältävien faagieristeiden alhainen esiintymistaajuus tässä vahvistetussa kirjastossa, yksi noin 2 x 10^6 bakteerifaagissa, sopii yhteen sen ehdotuksen kanssa, että erytropoietiini esiintyy ihmisgenomissa yhtenä ainoana kopiona. Koko ihmisgenomin DNA:n Southern blot-hybridisointi etyropoietiinigeenin Apa I-palan tai muiden restriktiopalojen kanssa antoi vain yhden ainoan hybridisoituvan vyöhykkeen ilman mitään muita kovin homologisia DNA-alueita.

ESIMERKKI 2

Apa I-restriktiopalan selektoiminen

Ekspressiovektoreiden rakentamista varten valmistettiin etyropoietiini-geenin Apa I-restriktiopala käyttämällä tässä yhteydessä viitteenä mainitussa julkaisussa Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467, 1967, kuvattuja tekniikoita. Lyhyesti sanottuna

eristetty faagi-DNA pilkottiin restriktioentsyymillä Apa I (Bethesda Research Laboratories), minkä jälkeen erotettiin 1-prosenttisella agaroosigeelillä ja eristettiin elektroeluoimalla, uuttamalla fenolilla ja saostamalla etanolilla. Fragmentti vahvistettiin osittaissekvenssoimalla esimerkin 1 mukaisesti.

Seuraavassa viitataan kuvioon 1. Insertoitu Apa I-restriktiopala sisälsi 58 bp 5' translatoimattomia sekvenssejä (nukleotidit 00010058), joita seurasivat sekvenssit, jotka koodaavat oletettua 27 aminohapon signaalipeptidiä, valmista proteiinia, neljää oletettua välisekvenssiä, ja 222 bp 3' ei-koodaava DNA-sekvenssi. Geenin 5'-päässä sijaitsee Apa I-kohta 58-emäsparin verran ylävirtaan päin katsottuna proteiinisekvenssin ATG-aloituskodonista (0058). Tämä 5'-kohta (0001) valittiin, jotta vältettäisiin väärä aloituskohta välittömästi ylävirtaan päinkatsottuna Apa I-restriktiokohdasta samalla, kun mukaan otettiin oletetut säätelysekvenssit, joita pidettiin tärkeinä tehokkaalle sibosomaaliselle sitoutumiselle ja prosessoinnille. Apa I-kohta 3' päässä (2426) valittiin, jotta saataisiin mukaan oletetut prosessointisignaalit useimmissa 3' translatoimattomissa sekvensseissä samalla, kun poistettiin kauempana alavirtaa sijaitsevat sekvenssit. Täydellisen erytropoietiinigeenin, mukaanlukien intronisekvenssien, käytön tarkoituksena oli saada mukaan introneissa sijaitsevat potentiaaliset säätelysekvenssit tai parantavat sekvenssit, jotka saattavat vaikuttaa erytropoietiini-geenin ilmentymiseen tai proteiinin modifioitumiseen tai erittymiseen.

ESIMERKKI 3

<u>Ekspressioplasmidien, joissa on Apa I-restriktiopala, rakentaminen</u>

2426 bp Apa I-restriktiopala, joka sisälsi ihmisen ehjän erytropoietiini-geenin, insertoitiin kahteen ekspressiovekto-

riin, rakennelmiin pD11 ja pBD, joiden kummankin pohjana oli erilainen nisäkäspromoottori.

Plasmidi-ekspressiovektori pD11 saatiin jo kuvatusta plasmidista (Nucleic Acids Research 13:841-857, 1985, joka tässä yhteydessä on mainittu nimenomaan viitteenä). Tämä sisälsi SV-40 (simian virus 40) tehostussekvenssejä ja replikaation alkamiskohdan sekä adenovirus-2:n MDL (major late promoter)-promoottori- ja kolmiosaisen leader-sekvenssin. Ihmiserytropoietiinin genomisekvenssien Apa I-pala (kuvio 1) geelipuhdistettiin ja yksisäikeiset päät täytettiin käsittelemällä T4 DNA-polymeraasilla. Molempiin tylppiin päihin liitettiin Bam Hi-linkkerit ja rakenne insertoitiin pD11:n ainutkertaiseen B-Bam HI-restriktiokohtaan, jotta voitaisiin ohjata erytropoietiini-geenin transkriptio voimakkaasta promoottorista.

Saadun ekspressioplasmidin pD11-Ep, jossa on Apa I-pala (Ep), rakenne on kuvattu kuviossa 2. Plasmidi pD11 sisältää 350 bp pitkän adenoviruksen left-pään (0-1). SV-40-viruksesta saadut aloitus- ja tehostussekvenssit (E), adenoviruksen MLP (major late promoter) promoottorin, adenovirus-2:n kolmiosaisen leader-osan (L1-3) ja kolmannen leader 5'-katkaisukohdan (5' ss), immunoglobuliinin 3'-katkaisukohdan (3' ss) ja myöhäisen SV-40 polyadenylaatiosignaalin (pA9 (pML:n Eco RI (RI)-restriktiokohdassa. Rekombinanttiplasmidit kloonattiin E.coli HB101-kantaan ja puhdistettiin sentrifugoimalla isopyknisesti kesiumkloridissa. Ekspressioplasmidin pD11-Ep pituus on noin 6500 bp. Rakenne vahvistettiin restriktiokartoituksen ja osittaisen dideoksinukleotidisekvenssoinnin avulla.

Plasmidissa pBD on MT-I-promoottorisekvenssi (Glanville, Durham & Palmiter, Nature 292:267-269, 1981, mainittu tässä yhteydessä nimenomaan viitteenä) ja selektoitavan DNFR-markkerisekvenssin pUC-plasmidissa. Seuraavassa viitataan kuvioon 3. 2426 bp Apa I-restriktiopala (EP) insertoitiin ainutkertaiseen Sma I-restriktiokohtaan plasmidissa pBD, jolloin saatiin ekspressioplasmidi pBD-EP. DHFR-sekvenssi plasmidissa pBD-EP

liittyi SV40-viruksesta saatuun alku- ja tehostussekvensseihin ja hepatiitti B pinta-antigeeni-polyadenylaatiosekvensseihin. pBD-EP prosessoitiin oleellisesti samalla tavoin kuin edellä on kuvattu plasmidille Pd11-EP.

Vaikkakin näissä vahvistavissa kokeissa käytettiin plasmidivektoreita, Apa I-erytropoietiini-geenipalan viemiseen isäntäsolulinjoihin voidaan käyttää samalla tavoin virus- tai retrovirus-ekspressiovektoreita. Sopivia DNA-viruksia tähän tarkoitukseen saattaisivat olla adenovirus tai BPD (Bovine Papilloma Virus). Myös sopivia retrovirusvektoreita tunnetaan ja niitä on saatavissa. Huomattakoon, että tällaisessa RNA (retrovial)-vektorissa olisi Apa I-restriktiopalan antisense-juoste, so. juoste, jonka sekvenssi vastaa kuviossa 1 esitetystä sense-juosteesta transkriptoitua RNA:ta tai sen allyyliä. Retrovirusvektori sisältäisi myös sekvenssit transtoimiville faktoreille, jotka tarvitaan virusgenomin käänteistranskriptioon ja viruksen DNA-muodon integroimiseen insäntägenomiin.

ESIMERKKI 4

Nisäkässolujen transfektointi

Kumpikin kahdesta nisäkässolulinjasta transfektoitiin kummallakin pD11-EP ja pBD-EP-rakenteella. Nisäkässolulinjat, COS-7 (apinan munuaiset) ja BHK (hamsterinpoikasen munuaiset) ylläpidettiin Dulbecco'n MEM-alustassa, joka sisälsi 10 % vasikansikiöseerumia. Solut kasvatettiin ja kun yhtenäisyys oli 50 - 70 %, ne transfektoitiin kalsiumfosfaattimenetelmällä (Virology 52:456-467, 1973). BHK on peräisin munuaisten epitelisoluista, joita yleisesti pidetään kaikkein todennäköisimpinä soluina, jotka tuottavat erytropoietiinia luonnontilassa, kun nisäkäs on aneeminen tai hypoksinen. Nämä solut saattavat siten tunnistaa kriittisiä säätelysekvenssejä erytropoietiinigeenin Apa I-palassa ja sen jälkeen tehokkaasti prosessoida ja tuottaa erytropoietiini-glykoproteiinia.

Solujen väliaikaista ekspressointia varten 100 mm viljelymaljassa käytettiin yhteensä 20 µg DNA:a 10 µg pD11-EP-plasmidia, jossa oli erytropoietiini-geeni, ja 10 µg kantajana toimivaa lohensiittiö-DNA:a. Supernatantit otettiin talteen 48 tunnin kuluttua, sentrifugoitiin 10 minuuttia 400 g voimalla solujen ja jäännösten poistamiseksi ja pakastettiin -20°C:ssa. Solut otettiin talteen erikseen. Taulukossa 1 on annettu väliaikaisen ekspressoinnin tulokset kokeista, joissa transfektointi suoritettiin vain plasmideilla pD11-EP. Arvot ovat peräisin 3 kokeesta kullakin solutyypillä.

TAULUKKO 1

Erytropoietiini/ml viljelmää

Nisäkässolut	Proteiini, µg	Yks. (in vitro-biomääritys)
BHK	3,4±0,2	270±16
COS-7	3,2±0,4	255±32

Havaitut erytropoietiini-määrät, jotka erittyivät joko COS-7 tai BHK-nisäkässolulinjojen supernatanttiin, olivat 80 kertaa korkeammat kuin mitä aikaisemmin on raportoitu erytropoietiinia koodaavan cDNA:n väliaikaiselle ekspressoimiselle tai muiden rakenteiden väliaikaiselle ekspressoimiselle käytettäessä ehjiä erytropoietiini-geenejä.

Stabiilien solulinjojen, jotka tuottavat suuria määriä erytropoietiinia, kehittämiseksi kotransfektoitiin joko COS-7 tai BHK-solut pD11-plasmidin ja pDHFR-1a-plasmidin, joka sisältää cDNA:n dihydrofolaattireduktaasin, kanssa samanlaiseen nisäkässoluvektoriin. Transfektointimenettelyä modifioitiin siten, että kotransfektoitiin 5 µg pD11-EP-plasmidia, 5 µg pDHFR-1a-plasmidia ja 10 µg kantaja-DNA:ta. Sen jälkeen, kun oli vielä inkuboitu 18 - 24 tuntia, viljelmiin lisättiin eri konsentraatiot metotreksaattia (10 nM - 1mM). DHFR-geenin sisältämien solujen tulisi jäädä eloon selektiivisessä alustassa. Usean lisäpäivän inkuboimisen jälkeen eristettiin metotreksaatille resistentit elävät pesäkkeet, kasvatettiin ja pesäkkeet seulottiin supernatantin erytropoietiini-bioaktiivisuuden perus-

teella. Noin puolet metotreksaatille resistenteistä pesäkkeistä, jotka määritettiin, erittivät havaittavan määrän erytropoietiini-aktiivisuutta.

Stabiilien solulinjojen, joissa on ekspressiovektori pBD-EP, kehittämiseksi transfektoitiin BHK-solut kalsiumfosfaattimenetelmällä. 18 - 24 tunnin kuluttua näihin viljelmiin lisättiin metotreksaattia sen konsentraatioiden vaihdellessa välillä 1 μm - 1 mM. Usean lisäpäivän inkuboimisen jälkeen eristettiin elävät pesäkkeet, jotka olivat resistenttejä näille suhteellisen korkeille metotreksaattimäärille, kasvatettiin ja seulottiin. Tässä koesarjassa kaikki metotreksaatille resistentit pesäkkeet, jotka määritettiin, erittivät havaittavissa olevan määrän erytropoietiini-aktiivisuutta.

Etyropoietiinigeenin ja DHFR-geenin sisältämän transkriptionaalisen yksikön ilmentymisen optimoimiseksi kasvatettiin BHK-solulinjoja, jotka sisälsivät joko plasmidin pBD-Ep tai plasmidin pD11-Ep ja jotka erittivät suuria määriä erytropoietiineja, useita kertoja kasvavien metotreksaattikonsentraatioiden kautta (Nature 325:271-273, 1985). Sen sijaan, että olisi vähitellen lisätty solulinjohin kohdistuvaa selektiivistä painetta lisäämällä metotreksaatin konsentraatiota pienin askelin, soluihin kohdistettiin välittömästi erittäin korkeat metotreksaattimäärät (so. 1 mM). Vain muutama solu jäi eloon, mutta nämä solut olivat oletettavasti liittäneet plasmidirakenteen ilmentymiselle erityisen edulliseen DNA-alueeseen (nk. "hot spot"-alue) ja/tai niillä ole oletettavasi monta kopiota rakennetusta transkriptionaalisesta yksiköstä. Tällä tavoin valittiin yhden vaiheen avulla eniten tuottavat solulinjat. Solulinjoja (mukaan lukien taulukossa 2 ovat F, 7,2 ja S 5,2) pidettiin stabiileina, jos erytropoietiinin tuottokyky pysyi korkeana yli 15 kasvatuksen ajan ilman selektiivistä metotreksaattipainetta.

Solupellettien sisältämän erytropoietiinin aktiivisuusmääriä ei voitu määrittää, koska solu-uutteissa oli mukana merkittä-

västi määritysinhibiittoreita. Taulukossa 2 esitetyt tulokset eivät siten ole analyysejä erytropoietiini-proteiinin solunsisäisistä määristä vaan pikemminkin solulinjojen tuottaman ja supernatanttiin erittämän erytropoietiini-proteiinin määrästä.

TAULUKKO 2

Rekombinantti-erytropoietiinin ekspressio stabiilisti transfektoiduista BHK-solulinjoista

Solulinja	Erytropoietiini/ml supernatantti Proteiini, µg	Yks. (in vitro-biomääritys)
pBD-EP		
F 1,1	12,4	970
F 3,4	32,0	2500
F 6,1	79,6	6210
F 7,2	84,1	6728
pD11-EP		
S 1,2	6,4	500
S 2,4	64,2	5000
S 5,2	82,1	6400

Havaitut erytropoietiinin erittymismäärät vastaavat nimellismäärinä lähes seitsemää miljoonaa yksikköä litraa kohti. Tällaiset nimellismäärät määritetään kertomalla ml kohti havaittu saanto tuhannella, jolloin saadaan suuremmassa mitassa odotettavissa oleva saanto litraa kohti.

Havaitut erytropoietiinin erittymismäärät, kun käytettiin Apa I-palaa, olivat suuruusluokaltaan 300 kertaa suurempia kuin mitä aikaisemmin on raportoitu (Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7580-7584, marraskuu 1985) stabiilisti transformoidulla CHO-solulinjalle, joka sisältää ihmiserytropoietiinigeenin eri genomipalan.

Näiden transfektiomääritysten kontrollikokeisiin sisältyivät supernatantit transfektoimattomista soluista ja solujen, jotka oli transfektoitu muita proteiineja, mukaan lukien bakteeripe-

räistä kloramfeenikoli-asetyylitransferaasia ja ihmisen koagulointiproteiinia, faktoria IX, koodaavaa DNA:ta sisältävillä plasmideilla, rinnakkaisviljelmät. Millään kontrolliviljelmillä, valetransfektoinneilla tai viljellyillä soluilla, jotka oli transfektoitu muilla geeneillä, ei ollut havaittavissa olevaa erytropoietiini-aktiivisuutta. Edellä olevissa erytropoietiini-geenillä suoritetuissa koesarjoissa havaittiin myös, että selektoiduille solulinjoille saadut ilmentymistasot eivät riippuneet siitä, oliko selektoitu markkeri kotransfektoitu yhdessä erytropoietiini-geenin kanssa tai oliko se insertoitu Apa I-palan sisältämään plasmidiin ennen transfektointia (arvoja ei ole annettu).

Muihin tyypillisiin transfektointimenetelmiin, jotka sopivat tämän keksinnön toteuttamiseen, kuuluvat DEAE-dekstraanivälitteiset transfektointitekniikat, lysotsyymifuusio tai erytrosyyttifuusio, raapiminen, suora sisäänvienti, osmoottinen shokki tai sakkaroosishokki, suora mikroinjisointi, epäsuora mikroinsijointi, kuten erytrosyyttivälitteisten tekniikoiden avulla ja/tai sähkövirtojen kohdistaminen isäntäsoluihin. Transfektoinnilla tarkoitetaan geneettisen informaation siirtämistä ja erityisesti ihmisen erytropoietiinigeenin Apa I-restriktiopalan koodaaman informaation siirtämistä soluun eristetyn DNA:n, RNA:n tai synteettisen nukleotidipolymeerin avulla. Edellä olevaa luetteloa transfektointitekniikoista ei tule pitää kattavana, sillä epäilemättä tullaan kehittämään myös muitakin menetelmiä, jolla geneettinen informaatio viedään soluihin. Apa I-restriktiopala yhdistetään tyypillisesti (ligatoidaan) toiminnallisesti ennen transfektointia muihin nukleiinihapposekvensseihin, kuten promoottori-, tehostus- ja polyadenylaatiosekvensseihin. Vaikkakin kuvatut isäntäsolulinjat ovat nisäkäsperäisiä ja munuaisen epitelisoluja pidetään erityisen hyvinä, tätä keksintöä toteutettaessa voidaan käyttää myös muita eukaryoottisia sekä prokaryoottisia (bakteerit tai hiivat) isäntäsolulinjoja; nisäkäsgeenien aivan äskettäiset viemiset kasvisoluihin antavat mahdollisuuden käyttää myös kasvi- tai leväsoluja.

ESIMERKKI 5

Erytropoietiinin ilmentäminen transfektoiduista solulinjoista

Rekombinantti-erytropoietiiniproteiini, joka erittyi transfektoitujen solulinjojen supernatanttiin, oli biologisesti aktiivista. Hormonia erittyi suuret määrät: 7000 yksikköön asti millilitraa kohti.

Erytropoietiinin biologisen aktiivisuuden in vitro määrittäminen perustui erytroidipesäkkeiden (CFU-E:sta; erytroidipesäkkeitä muodostavat solut) hiiren luuydinsolujen viljelmissä plasmahyytymässä (Blood Cells 4:89-103, 1978). Tämän määrityksen herkkyys on noin 5 milliyksikköä/ml. Määrityksen standardina käytetty erytropoietiini oli aneemisen lampaan plasmasta saatu, osittain puhdistettu valmiste (Connaught, vaihe 3 Ep, erä 3026). Supernatantit määritettiin kasvatetuista solulinjoista, joita oli kasvatettu 24 tuntia tuoreessa alustassa ilman metotreksaattia. Supernatantti laimennettiin 1:200 alustalla ja lisättiin 1 - 10 mikrolitraa määritysviljelmän millilitraa kohti viljelmän sisältäessä 2 x 10^5 luuydinsolua, 10 % sitratoitua naudanplasmaa, 20 % vasikansikiöseerumia, 10 % naudanseerumialbumiinia ja 1,6 % naudanalkiouutetta (Gibco). 36 - 48 tunnin inkuboinnin jälkeen plasmahyytymät kiinnitettiin mikroskooppilevyille, niiden hemoglobiini värjättiin bentsidiinillä ja erytroidipesäkkeet laskettiin. Kun erytropoietiinia ei oltu lisätty, ei havaittu mitään CFU-E-peräisiä pesäkkeitä. Optimaalinen erytroidipesäkkeiden kasvu (havaittuja CFU-E-soluja 100 - 150 x 10^4 luuydinsolua kohti) havaittiin rutiininomaisesti käyttämällä 50 mU (0,64 nanogrammaa) erytropoietiinia viljelmän ml kohti. Erytropoietiinihormoneja erittyi suuria määriä transfektoitujen solulinjojen supernatanttiin, kts. taulukot 1 ja 2, 7000 yksikköön asti ml kohti. Olettamalla, että rekombinantti-erytropoietiinilla on yhtä suuri spesifinen aktiivisuus kuin luonnon erytropoietiinilla (78.000 yksikköä/mg proteiinia) biologinen määritys

vastaa noin 80 µg erytropoietiini-proteiinia millilitraa kohti.

Valituista solulinjoista saaduista supernatanteista määritettiin lisäksi immunologisesti reaktiivinen erytropoietiini kompetetiivisen radioimmunomäärityksen avulla käyttämällä polyvalenttista anti-ihmis-erytropoietiini-kaniini-anti-seerumia (J.Cell.Physiol. 118:87-96, 1984). Radioimmunomäärityksellä mitattu proteiinimäärä vastasi biologisen määrityksen avulla arvioitua proteiinimäärää. Nämä arvot osoittavat, että transfektoidut solulinjat ekspressoivat ja erittävät erytropoietiini-proteiinia, joka oli yli 98-prosenttisesti aktiivista.

Transfektoitujen solujen tuottama rekombinantti-erytropoietiini karakterisoitiin edelleen sen osoittamiseksi, että nämä solut erittivät autenttista hormonia. Valituista solulinjoista määritettiin in vivo erytropoietiini-aktiivisuus ekshypoksisessa polysyateemisessä hiiressä. Kokeissa, joissa käytettiin osittain puhdistettua natiivia erytropoietiinia, oli aikaisemmin havaittu, että neuramidinaasikäsittely hävitti täydellisesti erytropoietiini-aktiivisuuden koskemattomassa eläimessä määritettynä (J.Biol.Chem. 247:5159-5160, 1958). Aktiivisuuden häviäminen johtui luultavasti siitä, että maksa poisti tehokkaammin desialoidun hormonin, koska neuramidinaasilla käsitelty erytropoietiini pysyi täysin aktiivisena in vitro. Tehokkaan in vivo biologisen aktiivisuuden havaitseminen osoittaa, että transfektoidut nisäkässolulinjat lisäävät asianmukaisella tavalla hiilihydraattia ja terminaalisia sialiinihappoja erytropoietiini-proteiiniin post-translaationaalisen modifioimisen aikana.

Erytropoietiinin aktiivisuus in vitro biologisessa määrityksessä neutraloitiin erillisissä kokeissa neutraloimalla viljelmään lisätty anti-ihmiserytropoietiini-vasta-aine.

Tyypillisten transfektoitujen solulinjojen supernatanttiin erittämästä erytropoietiinista määritettiin myös sen muihin

luuytimen kantasoluihin kohdistuvat proliferatiiviset vaikutukset. Rekombinantti-erytropoietiinista määritettiin sen vaikutus erilaisiin hiiren ja ihmisen luuytimestä saatuihin kantasoluihin, mukaanlukien CFU-E (erythroid colony-formin cells)-soluihin, BFU-E (erythroid burst-formin cells)-soluihin, CFU-GM (granulocyte-macrophage precursors)-prekursoreihin ja CFU-Mix (mixed-cell colony-formin cells)-soluihin (J.Cell.Phusiol-Suppl. 1:79-85, 1982; J.Cell.Physiol. 118: 87-96, 1984). Reaktiona rekombinantti-erytropoietiiniin esiintyi erytroidi-kantasoluilla lisääntymisreaktio, joka oli verrattavissa luonnon erytropoietiinilla havaittuun annos-reaktio-suhteeseen. CFU-GM- eikä myöskään CFU-Mix-soluilla ollut mitään lisääntymisreaktiota rekombinantti-erytropoietiinin suhteen tämän konsentraatiossa, jotka ulottuivat 10 yksikköön asti per ml määrityksen soluviljelmää.

Kun puhdistettu rekombinantti-erytropoietiini analysoitiin SDS-PAGE-menetelmällä pelkistävissä tai ei-pelkistävissä olosuhteissa, se käyttäytyi elektroforeesissa identtisesti erytropoietiinin kanssa, joka oli eristetty aplastisesta anemiasta kärsivien potilaiden virtsasta. Proteiinien mikroheterogeenisyyden havaittiin olevan samanlainen ja valtalajeilla oli identtiset molekyylipainot 34 kD.

Vaikkakin esillä olevaa keksintöä on kuvattu parhaana pidettyjen suoritusmuotojen avulla, taidoiltaan keskimääräinen henkilö kykenee edellä olevan selityksen luettuaan tekemään tässä esitettyihin seoksiin ja menetelmiin erilaisia muutoksia, suorittamaan vastaavia korvauksia tai tekemään muita muutoksia. Patentin antamaa suojaa rajoittaa siten vain oheisista patenttivaatimuksista ja vastaavista muodostuva määrittely.

Patenttivaatimukset

1. Oleellisesti puhdas DNA tai RNA, t u n n e t t u siitä, että se muodostuu ihmisen erytropoietiini-geenin 2,4 kb Apa I-restriktiopalaa vastaavasta nukleotidisekvenssistä (kuvio 1).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA tai RNA, t u n n e t t u siitä, että Apa I-restriktiopala muodostuu oleellisesti joko kuviossa 1 esitetyn sense-juosteen tai sen komplementtisen RNA-sekvenssin nukleotidisekvenssistä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA- tai RNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se on toiminnallisesti yhdistetty heterologiseen toiseen nukleiinihapposekvenssiin, joka kykenee saamaan aikaan sen ilmentymisen.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA tai RNA, t u n n e t t u siitä, että tämä toinen nukleiinihapposekvenssi on valittu yhdestä tai useammasta seuraavista: promoottorisekvenssit, tehostussekvenssit, polyadenylaatiosekvenssit, selektoitavat markkerisekvenssit, plasmidit, virus- ja retrovirus-ekspressiovektorit ja trans-vaikutteiset retrovirusfaktorit.

5. Nisäkässolulinja, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukaista DNA:ta tai RNA:ta sisältäviä soluja.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen nisäkässolulinja, t u n n e t t u siitä, että se käsittää soluja, jotka on stabiilisti transfektoitu mainitulla DNA-sekvenssillä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen solulinja, t u n n e t t u siitä, että solut ovat peräisin munuaisista.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen solulinja, t u n n e t t u siitä, että munuaissolut ovat epiteelisoluja.

9. Menetelmä biologisesti aktiivisen rekombinantti-ihmiserytropoietiinin ekspressoimiseksi, t u n n e t t u siitä, että inkuboidaan ihmiserytropoietiinigeenin 2,4 kb Apa I-restriktiopala (kuvio 1) ekspressiovektoriin, transfektoidaan nisäkäsisäntäsolulinja ihmisen erytropoietiinigeenin 2,4 kb Apa I-restriktiopalan sisältävällä vektorilla, isäntäsolulinjan transfektoituja soluja saatetaan kosketukseen viljelyalustan kanssa, joka sallii solujen ekspressoivan erytropoietiinin, ja otetaan ekspressoitunut erytropoietiini talteen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solulinja kykenee mahdollistamaan nimellistuoton, joka on vähintään kaksi miljoonaa yksikköä erytropoietiinia inkubointialustan litraa kohti.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Apa I-restriktiopala on plasmidissa tai viruksessa.

12. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nisäkäsisäntäsolulinja on valittu ryhmästä, johon kuuluvat eukaryoottiset solut.

13. Jonkun patenttivaatimuksen 9 - 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transfektoidut solut pysyvästi ekspressoivat erytropoietiinin.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pysyvä ekspressio aikaansaadaan altistamalla solut metotreksaatin suurelle konsentraatille.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetyn metotreksaatin pitoisuus on suuruusluokkaa 1 mM.

Patentkrav

1. Väsentligen rent DNA eller RNA, k ä n n e t e c k n a t därav, att det består av nukleotidsekvenser (figur 1) motsvarande en human erytropoietin-gens 2,4 kb Apa I-restriktionsfragment.

2. DNA eller RNA enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att Apa I-restriktionsfragmentet består väsentligen av nukleotidsekvensen av antingen sense-sträng enligt figur 1 eller dess komplementära RNA-sekvens.

3. DNA- eller RNA-sekvens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den är funktionellt bunden vid en heterologisk andra nukleinsyrasekvens, som förmår åstadkomma dess expression.

4. DNA eller RNA enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att denna andra nukleinsyrasekvens är vald bland en eller flera av följande: promotorsekvenser, enhancersekvenser, polyadenylationssekvenser, selektiverande markersekvenser, plasmider, virus- och retrovirus-expressionsvektorer och trans-funktionella retrovirusfaktorer.

5. Cellinje av däggdjur, k ä n n e t e c k n a t därav, att den omfattar celler innehållande DNA eller RNA enligt patentkravet 3 eller 4.

6. Cellinje av däggdjur enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att den omfattar celler, som stabilt transfekterats av nämnda sekvenser.

7. Cellinje enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att cellerna härrör från njurar.

8. Cellinje enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att njurcellerna är epitelceller.

9. Förfarande för expression av biologiskt aktivt rekombinant-humanerytropoietin, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett 2,4 kb Apa I-restriktionsfragment (figur 1) av en humanerytropoietingen inkuberas, en cellinje av en däggdjursvärd transfekteras med en vektor innehållande en humanerytropoietingens 2,4 kb Apa I-restriktionsfragment, värdcellinjens transfekterade celler bringas i kontakt med kulturmediet för att möjliggöra cellernas expression av erytropoietin, och det expresserade erytropoietinet tillvaratas.

10. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att cellinjen förmår möjliggöra ett nominellt utbyte på åtminstone två miljoner enheter erytropoietin per liter inkuberingsmedium.

11. Förfarande enligt patentkravet 9 eller 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att Apa I-restriktionsfragmentet finns i en plasmid eller ett virus.

12. Förfarande enligt patentkravet 9 eller 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att cellinjen av däggdjursvärden är vald ur gruppen bestående av eukaryotiska celler.

13. Förfarande enligt något av patentkraven 9 - 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att de transfekterade cellerna varaktigt expresserar erytropoietin.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att den varaktiga expression erhålls genom att underkasta cellerna för en stor koncentration av metotrexat.

15. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att det använda metotrexatets koncentration är av storleksordningen 1 mM.

DNA:epo:apa-geeni

ENSIMMÄINEN NUKLEOTIDI: +1

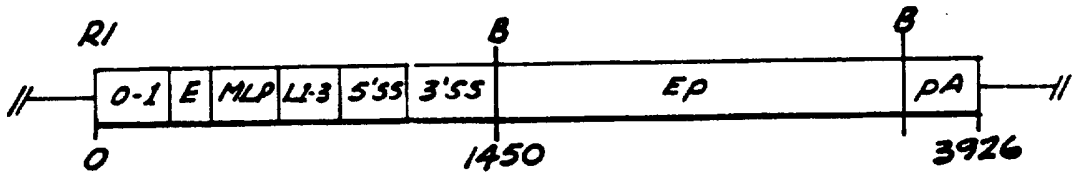
DNA:n pituus: 2426

Ensim-	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
mäinen as.	|	|	|	|	|	|	|	|	|	|
+1	CCCGGTGTGG	TCACCCGGCG	CGCCCCAGGT	CGCTGAGGGA	CCCCGGCCAG	GCGCGGAGAT	GGGGGTGCAC	GGTGAGTACT	CGCGGGCTGG	GCGCTCCCGC
+101	CCGCCCGGGT	CCCTGTTTGA	GCGGGGATTT	AGCGCCCCGG	CTATTGGCCA	GGAGGTGGCT	GGGTTCAAGG	ACCGGCGACT	TGTCAAGGAC	CCCGGAAGGG
+201	GGAGGGGGGT	GGGGCAGCCT	CCACGTGCCA	GCGGGGACTT	GGGGGAGTCC	TTGGGGATGG	CAAAAACCTG	ACCTGTGAAG	GGGACACAGT	TTGGGGGTTG
+301	AGGGGAAGAA	GGTTTGGGGG	GTTCTGCTGT	GCCAGTGGAG	AGGAAGCTGA	TAAGCTGATA	ACCTGGGCGC	TGGAGCCACC	ACTTATCTGC	CAGAGGGGAA
+401	GCCTCTGTCA	CACCAGGATT	GAAGTTTGGC	CGGAGAAGTG	GATGCTGGTA	GCCTGGGGGT	GGGGTGTGCA	CACGGCAGCA	GGATTGAATG	AAGGCCAGGG
+501	AGGCAGCACC	TGAGTGCTTG	CATGGTTGGG	GACAGGAAGG	ACGAGCTGGG	GCAGAGACGT	GGGGATGAAG	GAAGCTGTCC	TTCCACAGCC	ACCCTTCTCC
+601	CTCCCCGCCT	GACTCTCAGC	CTGGCTATCT	GTTCTAGAAT	GTCCTGCCTG	GCTGTGGCTT	CTCCTGTCCC	TGCTGTCGCT	CCCTCTGGGC	CTCCCAGTCC
+701	TGGGCGCCCC	ACCACGCCTC	ATCTGTGACA	GCCGAGTCCT	GCAGAGGTAC	CTCTTGGAGG	CCAAGAAGGC	CGAGAATATC	ACGGTGAGAC	CCCTTCCCCA
+801	GCACATTCCA	CAGAACTCAC	GCTCAGGGCT	TCAGGGAACT	CCTCCCAGAT	CCAGGAACCT	GGCACTTGGT	TTGGGGTGGA	GTTGGGAAGC	TAGACACTGC
+901	CCCCCTACAT	AAGAATAAGT	CTGGTGGCCC	CAAACCATAC	CTGGAAACTA	GGCAAGGAGC	AAAGCCAGCA	GATCCTACGC	CTGTGGCCAG	GGCCAGAGCC
+1001	TTCAGGGACC	CTTGACTCCC	CGGGCTGTGT	GCATTTCAGA	CGGGCTGTGC	TGAACACTGC	AGCTTGAATG	AGAATATCAC	TGTCCCAGAC	ACCAAAGTTA
+1101	ATTTCTATGC	CTGGAAGAGG	ATGGAGGTGA	GTTCCTTTTT	TTTTTTTTTT	CCTTTCTTTT	GGAGAATCTC	ATTTGCGAGC	CTGATTTTGG	ATGAAAGGGA

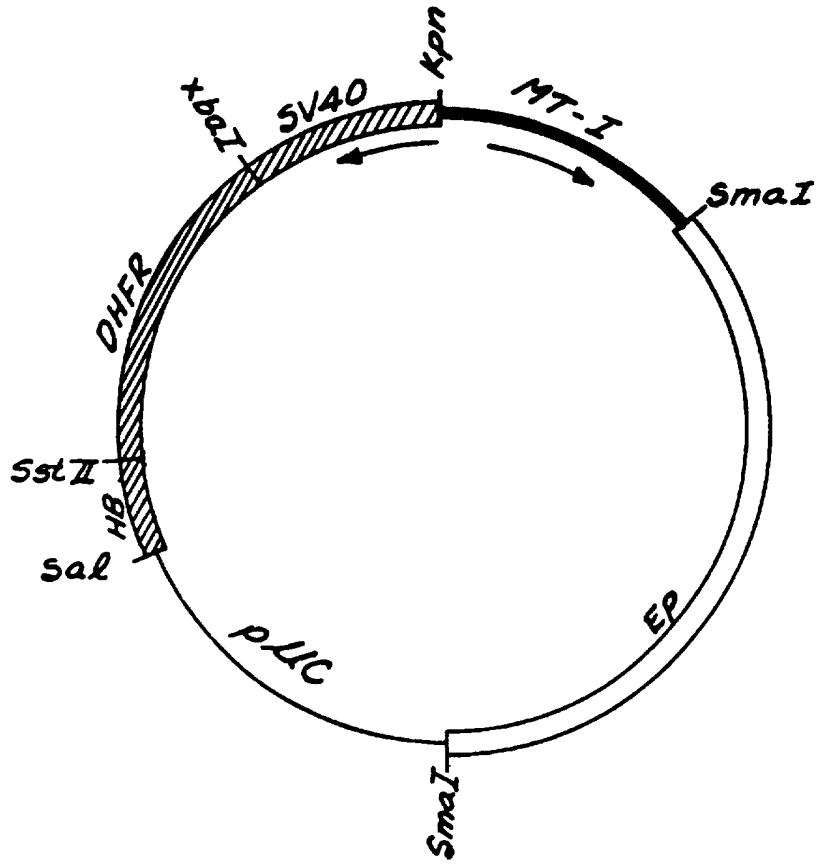
KUVA 1A

+1201 GAATGATCGA GGGAAAGGTA AAATGGAGCA GCAGAGATGA GGCTGCCTGG GCGCAGAGGC TCACGTCTAT AATCCCAGGC TGAGATGGCC GAGATGGGAG
+1301 AATTGCTTGA GCCCCGGAGT TTCAGACCAA CCTAGGCAGC ATAGTGAGAT CCCCCATCTC TACAAACATT TAAAAAAATT AGTCAGGTGA AGTGGTGCAT
+1401 GGTGGTAGTC CCAGATATTT GGAAGGCTGA GGCGGGAGGA TCGCTGGAGC CCAGGAATTT GAGGCTGCAG TGAGCTGTGA TCACACCACT GAACTCCAGC
+1501 CTCAGTGACA GAGTGAGGCC CTGTCTCAAA AAAGAAAAGA AAAAAGAAAA ATAATGAGGG CTGTATGGAA TACGTTCATT ATTCATTCAC TCACTCACTC
+1601 ACTCATTCAT TCATTCATTC ATTCAACAAG TCTTATTGCC TACCTTCTGT TTGCTCAGCT TGGTGCTTGG GGCTGCTGAG GGGCAGGAGG GAGAGGGTGA
+1701 CATCCCTCAG CTGACTCCCA GAGTCCACTC CCTGTAGGTC GGGCAGCAGG CCGTAGAAGT CTGGCAGGGC CTGGCCCTGC TGTCGGAAGC TGTCCTGCGG
+1801 GGCCAGGCCC TGTTGGTGAA CTCTTCCCAG CCGTGGGAGC CCCTGCAGCT GCATGTGGAT AAAGCCGTCA GTGGCCTTCG CAGCCTCACC ACTCTGCTTC
+1901 GGGCTCTGGG AGCCCAGGTG AGTAGGAGCG GACACTTCTG CTTGCCCTTT CTGTAAGAAG GGGAGAAGGG TCTTGCTAAG GAGTACAGGA ACTGTCCGTA
+2001 TTCCTTCCCT TTCTGTGGCA CTGCAGCGAC CTCCTGTTTC CTCCTTGGCA GAAGGAAGCC ATCTCCCCTC CAGATGCGGC CTCAGCTGCT CCACTCCGAA
+2101 CAATCACTGC TGACACTTTC CGCAAACTCT TCCGAGTCTA CTCCAATTTC CTCCGGGGAA AGCTGAAGCT GTACACAGGG GAGGCCTGCA GGACAGGGGA
+2201 CAGATGACCA GGTGTGTCCA CCTGGGCATA TCCACCACCT CCCTCACCAA CATTGCTTGT GCCACACCCT CCCCCGCCAC TCCTGAACCC CGTCGAGGGG
+2301 CTCTCAGCTC AGCGCCAGCC TGTCCCATGG ACACTCCAGT GCCACCAATG ACATCTCAGG GGCCAGAGGA ACTGTCCAGA GAGCAACTCT GAGATCTAAG
+2401 GATGTCACAG GGCCAACTTG AGGGCC

KUVA 1B


RI
B
B
0-1
E
MLP
L1-3
5'SS
3'SS
EP
pA
0
1450
3926

kuva 2


Kpn
MT-1
SmaI
SV40
XbaI
DHFR
SstII
HB
Sal
pUC
EP
SmaI

kuva 3