



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **44 882** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 5/10 B,
C 07K 14/505 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 5010104, 15.11.1991

(24) Дата начала действия патента: 15.03.2002

(30) Приоритет: 04.12.1984 US 677.813
03.01.1985 US 688.622
22.01.1985 US 693.258

(46) Дата публикации: 15.03.2002

(72) Изобретатель:

Фритч Эдвард, US,
Хьювик Родни М., US,
Джекобс Кеннет, US

(73) Патентовладелец:

ДЖЕНЕТИКС ИНСТИТУТ, ИНК., US

(54) ФРАГМЕНТ ГЕНОМНОЙ ДНК, КОДИРУЮЩИЙ ЭРИТРОПОЭТИН, ФРАГМЕНТ кДНК, КОДИРУЮЩИЙ ЭРИТРОПОЭТИН, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Описываются клонированные гены для человеческого эритропоэтина (ЭПО), получаемого из фетальной печени человека, которые обнаруживают чрезвычайно высокие уровни экспрессии. Также описывается экспрессия указанных генов in vitro для получения активного человеческого ЭПО.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 3, 15.03.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **44 882** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 5/10 B,**
C 07K 14/505 B

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 5010104, 15.11.1991

(24) Effective date for property rights: 15.03.2002

(30) Priority: 04.12.1984 US 677.813
03.01.1985 US 688.622
22.01.1985 US 693.258

(46) Publication date: 15.03.2002

(72) Inventor:

Fritch Edward, US,
Hewick Rodney M., US,
Jacobs Kenneth, US

(73) Proprietor:

GENETICS INSTITUTE, INC., US

(54) ERYTHROPOIETIN CODING FRAGMENT OF GENOMIC DNA, CDNA CODING ERYTHROPOIETIN, METHOD FOR PRODUCTION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN (VARIANTS), METHOD FOR PRODUCTION OF PHARMACEUTICAL FORMULATION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN (VARIANTS)

(57) Abstract:

Cloned genes for human erythropoietin (EPO) obtained from human fetal liver that provide surprisingly high levels of expression. Also described the expression of said genes in vitro to produce active human EPO.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 3, 15.03.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A
4 4 8 8 2
C 2

U A
4 4 8 8 2
C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **44 882** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 5/10 B,
C 07K 14/505 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
5010104, 15.11.1991

(24) Дата набуття чинності: 15.03.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 04.12.1984 US 677.813
03.01.1985 US 688.622
22.01.1985 US 693.258

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.03.2002

(72) Винахідник(и):

Фрітч Едвард , US,
Хьювік Родні М., US,
Джекобс Кеннет , US

(73) Власник(и):

ДЖЕНЕТИКС ІНСТІТУТ, ІНК., US

(54) ФРАГМЕНТ ГЕНОМНОЇ ДНК, ЩО КОДУЄ ЕРИТРОПОЕТИН, ФРАГМЕНТ КДНК, ЩО КОДУЄ
ЕРИТРОПОЕТИН, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕРИТРОПОЕТИНУ ЛЮДИНИ (ВАРІАНТИ), СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ЕРИТРОПОЕТИНУ ЛЮДИНИ (ВАРІАНТИ)

(57) Реферат:

Описано клоновані гени еритропоетину людини
(ЕПО), одержані з клітин фетальної печінки
людини, які характеризуються незвично високим

рівнем експресії. Описано також експресію
зазначених генів in vitro з метою одержання
активного ЕПО людини.

U
A
4
4
8
8
2
C
2

U
A
4
4
8
8
2
C
2

Опис винаходу

Настоящее изобретение касается клонированных генов для человеческого эритропоэтина, которые обеспечивают необычайно высокие уровни выражения, экспрессии указанных генов получения *in vitro* активного человеческого эритропоэтина.

Эритропоэтин (далее ЭПО) представляет собой циркулирующий гликопротеид, который стимулирует образование эритроцита в высших организмах. См. Carnot и др., *Compt Rend*, 143:384 (1906). Как таковой, ЭПО иногда упоминается как фактор, стимулирующий эритропоэз.

Продолжительность жизни человеческих эритроцитов составляет около 120 дней. Таким образом, около 1/120 общего числа эритроцитов разрушается ежедневно в ретикуло-эндотелиальной системе. Однако, относительно постоянное число эритроцитов продуцируется ежедневно для поддержания уровня эритроцитов все время (Guyton, *Textbook of Medical Physiology* стр. 56 - 60, W.B.Saunders Co., Филадельфия (1976).

Эритроциты продуцируются путем созревания и дифференцировки эритробластов в костном мозге, и ЭПО является Фактором, который воздействует на менее дифференцированные клетки и индуцирует их дифференцировку к эритроцитам (Guyton, выше).

ЭПО представляет собой многообещающее терапевтическое средство для клинического лечения анемии или, в частности, ренальной анемии. К сожалению, использование ЭПО еще не является общепринятым в практической терапии вследствие его малой доступности.

Для использования ЭПО в качестве терапевтического средства необходимо тщательно обсудить возможные вопросы антигенности, и поэтому предпочтительно, чтобы ЭПО был получен из сырья человеческого происхождения. Например, можно использовать человеческую кровь или мочу от пациентов, страдающих апластической анемией или подобными болезнями, которые выделяют большие количества ЭПО. Эти исходные материалы, однако, существуют в ограниченном запасе. См., например, Write и др., *Rec. Progr. Horm. Res.*, 16 - 219 (1960; Espada и др., *Biochem. Med*, 3:475 (1970); Fisher, *Phurm. Rev.*, 24:459 (1972) и Gordon, *Vitam. Horm. (N.Y.)*, 31:105 (1973).

Получение продуктов ЭПО, как правило, осуществляется через концентрацией очистку мочи пациентов, обнаруживающих высокие уровни ЭПО, таких, как больные апластической анемии или подобными заболеваниями. См., например, патенты США №№ 439780, 4303650 и 3865801, раскрытие которых введено сюда в качестве ссылки. Ограниченный запас такой мочи служит препятствием практическому использованию ЭПО и поэтому чрезвычайно желательно получать продукты ЭПО из мочи здоровых людей. Трудность в использовании мочи от здоровых людей заключается в низком содержании в ней ЭПО по сравнению с мочой пациентов, страдающих анемией. Кроме того, моча здоровых людей содержит определенные тормозящие факторы, которые действуют против эритропоэза в достаточно высокой концентрации, так, что удовлетворительный терапевтический эффект может быть получен от ЭПО только с последующей значительной очисткой.

ЭПО также может быть выделен из плазмы крови овцы, и отделение ЭПО от такой плазмы крови обеспечивает создание достаточно сильнодействующих и устойчивых водорастворимых препаратов. См. Goldwasser *Control Cellular Vit Develop.*, Часть А, стр. 487 - 494, Alan R. Ziss, Inc., Нью-Йорк (1981), которая введена сюда в качестве ссылки. ЭПО овцы, однако, можно было бы рассматривать антигенным в людях.

Таким образом, в то время как ЭПО является желательным терапевтическим средством, традиционные методики выделения и очистки, используемые с естественными источниками снабжения, являются недостаточными для массового производства этого соединения.

Sugimoto и др в патенте США 4377513 описывают один способ для массового производства ЭПО, содержащий размножения *in vivo* лимфобластоидных клеток человека, включающих Nomalva, BAL L - I, NAL L - I, TAL L - I и JBL.

В специальной литературе появилось описание получения ЭПО с использованием методов генетической инженерии другими авторами. Однако еще не опубликовано ни пригодного раскрытия, ни химической природы продукта. В противоположности этому, настоящая заявка предоставляет пригодное раскрытие массового производства белков, проявляющих биологические свойства человеческого ЭПО. Также является возможным путем этих методик получить белки, которые могут химически отличаться от аутентичного человеческого ЭПО и все же обнаруживать аналогичные (и в некоторых случаях улучшенные) средства. Для удобства все такие белки, проявляющие биологические свойства человеческого ЭПО, могут упомянуться далее как ЭПО, являются ли они химически идентичными ему или нет.

Настоящее изобретение касается клонирования гена, который выражает необычайно высокие уровни человеческого ЭПО, его экспрессии и массового производства *in vitro* активного человеческого эритропоэтина. Также описываются пригодные векторы экспрессии для получения ЭПО, экспрессивные клетки, схемы очистки и связанные с этим процессы.

Как описывается более подробно ниже, ЭПО был получен в частично очищенной форме и был подвергнут дальнейшей очистке до гомогенности и превращен трипсином для генерации специфических фрагментов. Эти фрагменты были очищены и подвергнуты определению последовательностей. Олигонуклеотиды ЭПО были затем сконструированы на основе этих последовательностей и синтезированы. Эти олигонуклеотиды были использованы для скрининга человеческой геномной библиотеки, из которой ген ЭПО был выделен.

Ген ЭПО был проверен на основе его ДНК-последовательности, которая спарила многие секвенированные

фрагменты триптического белка. Отрезок геномного клопа был затем использован для демонстрации путем гибридазации того, что мРНК ЭПО могла бы быть обнаружена в человеческой плодной (в возрасте 20 недель) мРНК была получена и подвергнута скринингу кДНК-библиотека печени плода человека. Были получены три
5 клона кДНК ЭПО (после скрининга ; 750000 рекомбинатов). Два из этих трех клонов были определены имеющими полную длину, как оценено по полной кодирующей последовательности и значительной 5'- и 3'-нетранслируемой последовательности. Эти кДНК были экспрессированы как в трансформированных клетках вируса SV-40 обезьяны (клеточная линия COS-I; Gluzman, Cell 23:175 - 182 (1981), так и в клетку личинка китайского хомячка (клеточная линия CHO; Urlaub. G. и Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. США 77:4216 - 4280
10 (1980). ЭПО, полученный из клеток CHO, является биологически активная ЭПО in vitro и in vivo. ЭПО, полученный из клеток CHO, также биологически активен in vitro и in vivo

кДНК-клон ЭПО имеет интересную открытую рамку считывания из 14 - 15 аминокислот /aa/ с инициатором и терминатором из 20 - 30 нуклеотидов /nt/ вверх по направленно кодирующей области. Типичный образец E.col, трансформированной клонированным геном ЭПО, был депонирован American Type Culture Collection, Rockville,
15 Maryland, где он имеется в наличии под входящим номером ATCC 40153.

Таблица 1 представляет собой последовательность оснований экзона 87 пар оснований гена ЭПО человека; Фиг. 1 иллюстрирует обнаружение мРНК ЭПО и мРНК печени плода человека;

Таблица 2 представляет аминокислотную последовательности белка ЭПО, выделенную из нуклеотидной последовательности λ -HEPOF L 13;

20 Таблица 3 представляет нуклеотидную последовательность кДНК ЭПО в λ -HEPOF L 13 (Показано схематически на Фиг. 2) и аминокислотную последовательность, выделенную из нее;

Фиг. 3 иллюстрирует относительно положению вставок ДНК четырех независимых геномных клонов человеческого ЭПО;

Фиг. 4 представляет собой карту очевидной интронной и экзонной структуры гена ЭПО человека;

25 Таблице 4 иллюстрирует ДНК-последовательность гена ЭПО, показанного на Фиг. 4В;

Фиг. 5А, 5В и 5С иллюстрирует конструирование вектора 91023/В/;

Фиг. 6 изображает SDS полиакриламидный гель-анализ ЭПО, полученного в клетках COS-I по сравнению з нативным ЭПО.

Таблица 5 иллюстрирует нуклеотидную и аминокислотную последовательности клона ЭПО, λ -HEPOF L 6;

30 Таблица 6 иллюстрирует нуклеотидную и аминокислотную последовательности клона ЭПО, λ -HEPOF L 8;

Таблица 7 иллюстрирует нуклеотидную и аминокислотную последовательность клона ЭПО, λ -HEPOF L 13;

Фиг. 8 представляет собой схематическое изображение плазмиды рdVPY-MMTheo (342 - 12).

Настоящее изобретение касается клонирования генов ЭПО и получение ЭПО путем экспрессии in vitro этих генов.

35 Патентная и научная литература изобилует способами, являющимися пригодными для получения рекомбинантных продуктов. В основном эти методики включают выделение или синтез требуемой геной последовательности и экспрессию этой последовательности либо в прокариотных, либо эукариотных клетках используя методики, обычно приемлемые для специалиста. Как только искомый ген изолирован, очищен и вставлен в вектор переноса (т.е. клонирован), его доступность в достаточном количестве обеспечена. Вектор с его клонированным геном переносится к природному микроорганизму или линии клеток, например, бактериям, дрожжам, клетками млекопитающих, таких, как COS-I (почка обезьяны), CHO (яичник китайского хомячка), линиям клеток насекомых и тому подобному, где вектор реплицируется как микроорганизм или линия клеток пролиферирует, и откуда вектор может быть выделен, при помощи общепринятых средств. Таким образом обеспечивается непрерывно возобновляемый источник гена для дальнейших манипуляций, модификаций и переносов к другим векторам или другим локусам в пределах того же вектора.

45 Экспрессия часто может быть получена путем переноса клонированного гена в должной рамке ориентации и считывания в подходящий сайт в векторе переноса так, что трансляционное считывание с прокариотного или эукариотного гена завершается синтезом белкового исходного вещества, содержащего аминокислотную последовательность, кодируемую клонированным геном, привязанном к Met или amino-концевой последовательности от прокариотного или эукариотного гена, в других случаях сигналы для транскрипционной и трндционной инициации могут подаваться пригодным геномным фрагментом клонированного гена. Множество специфических методик белкового расщепления может быть использовано для расщепления белкового походного вещества, если оно пролудировано, в требуемой точке, с тем, чтобы высвободить желательную аминокислотную последовательность, которую затем можно очистить традиционными способами.
50 В некоторых случаях белок, содержащий требуемую аминокислотную последовательность, продуцируется без необходимости применения специфических методик расщепления и может быть также высвобожден из клеток в экстрацеллюлярную питательную среду.

Выделение геномного клона человеческого ЭПО

60 Человеческий ЭПО был очищен до гомогенности от мочи пациентов, страдавших апластической анемией, как описано ниже. Полное переваривание этого очищенного ЭПО трипсином протеази дало фрагменты, которые были разделены высокoeffективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой, восстановлены из градиентных фракций и подвергнуты микросеквционному анализу. Последовательности триптических фрагментов подчеркнуты в Таблицах 2 и 3 обсуждены более подробно ниже. Две из аминокислотных последовательностей Val-Asn-Fhe-Tyr-Ala-Trp-Lys и Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg, были выбраны для
65 конструирования олигонуклеотидных зондов (заканчивающихся олигонуклеотидным пулом 17nL длины и 32-кратным дегенератом и олигонуклеотидным пулом 18 nt и длины 128-кратным дегенератором - из первого

триптического фрагмента, а также двумя пулами 14 пт длины, каждый 43-кратный дегенерат, из второго триптического фрагмента, соответственно. 38-кратный дегенеративный 17-мерный пул был использован для скрининга человеческой геномной ДНК-библиотеки в векторе Ch4 A /22/ с использованием модификации метода ампликации in situ Woo и O'Malley /47/ для получения фильтров для скрининга.

Арабские числа в кртых скобках, // - /GI/, используется в настоящем описании для ссылок на публикации, которые приводятся в числовом порядке в конце описания настоящего изобретения.

Фаг, гибридизирующий к 17мер, был образован, распределен на малые группы и спробован 14мер и 18мер пулами. Фаг, гибридизирующий к 17мер, 18мер и 14мер пулам, был счищен от пятен, а фрагменты были субклонированы в векторы M13 для секвенирования путем дидезокси-метода обрыва цепи, описанного Sanger и Conlson, /23/ (1977).

Таблица 1

gatcctacgcctgtggccagggccagagccttcagggacccttgactccccgggctgtgtgcatttcag
a

ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC
Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile

ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG
Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys

AGG ATG GAGgtgagtcccttttttttttttcttttcttttggagaatctcatttgcgagcctg
Arg MET Glu d

atattggatgaaagggagaatgatc

Таблица 2

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
-27
MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO

1 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
10
SH

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys SH Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
30
SH

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
50
Ala

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
70

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
90

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
110
120

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ly
130
140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Al
150
16

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
SH
166

Таблица 3

cccggagcc gaccggggc caccggccc gctctgctcc acaccggcc

ccctggacag . cgcacctctc ctccaggccc gtagggctgg ccctgcaccg cggagcttcc cgggatgaggg cccccgtgt

5

ggtcaccccg cgcgccccag gtcgctgagg gaccccgccc aggcgcggag

-27

MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
ATG GCG GTC CAC GAA TGT CCT

10

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG CTG TCG CTC CCT CTG GCG CTC CCA GTC CTG GCG

1 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
GCC CCA CCA CCG CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG CAG GCC AAG

15

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
GAG GCC GAG AAT ATC ACC ACC GGC TGT GCT GAA CAC TCC AGC TTG AAT CAG AAT ATC ACT

20

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG CAG CAG GCC

25

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC CTG

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT

30

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
GCC CTT CCG AGC CTC ACC ACT CTG CTT CCG GCT CTG CCA GCG CAG AAG GAA GCC ATC TCC

35

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CCG AAA

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG CAG GCC

40

SH Cys Arg Thr Gly Asp Arg TGA ccaggtg tgccacctg ggcatacca ccacctccct caccaacatt

gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct gacccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc

ccatggacac tccagtgcca gcaatgacat ctccaggggccc agaggaaactg tccagagagc aactctgaga

45

tctaaggatg tcacagggcc aacttgaggg cccagagcag gaagcattca gaggcagct ttaactcag

ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctccactcgcc accctgcaaa atttgatgcc aggacagct

ttggaggcga tttacctgtt ttgcacctta ccatcaggga caggatgacc tggagaactt aggtggcaag

50

ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcactccett ggtggcaaga gcccccttga caccgggggtg

gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg gcctctggct ctccatggggt ccaagttttg tgtattcttc

aacctcattg acaagaactg aaaccaccaa aaaaaaaaaa

55

Последовательность области, гибризирующая к 32-кратному дегенератному 17мер в одном из клонов, показана в Таблице 1. Эта последовательность ДНК содержит внутри открытой рамки считывания нуклеотиды, которые могут точно кодировать триптический фрагмент, используемый для выведения 17мер пула олигонуклеотидов. Кроме того, анализ последовательности ДНК показывает, что 17мер гибризирующая область содержалась внутри 87bp экзона, соединенная потенциальным акцептором сращивания и донорным сайтами.

60

Положительное подтверждение того, что эти два клон (обозначены здесь λ-НРО1 и λ-НРО2) являются геномными клонами ЭПО получено путем секвенирования дополнительных экзонов, содержащих другой триптический фрагмент, кодирующий информацию.

Выделение клонов кДНК ЭПО

65

Анализ Northern /56/ в отношении человеческой фетальной (возраст 20 недель) печеночной мРНК осуществляли с использованием 95 пт однонитиевого зонда, полученного из клон М13, содержащего участок

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

87bp экзона, описанного в Таблице 1. Как показано на фиг. 1, сильный сигнал может быть обнаружен в мРНК детальной печени. Точная идентификация этой полосы как мРНК ЭПО была достигнута с использованием того же зонда для скрининга λ -кДНК библиотеки бактериофага мРНК фатальной печени /25/. Несколько гибридирующих клонов было получено с частотой приблизительно 1 положительный на 250 000 подвергнутых скринингу рекомбинантов. Полная нуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности для этих клонов (λ -HEPOF L 13 и λ -HEPOF L 8) представлены в Таблицах 5 и 6. ЭПО-кодирующая информация содержится внутри 594nt в 5'-половине кДНК, включая очень гидрофобный 27 аминокислотный лидер и 166 аминокислотный созревший белок.

Идентификация N-конца созревшего белка была основана на N-концевой последовательности белка, выделяемого в моче людей с апластической анемией, как проиллюстрировано в Таблице 1 и как описано в работах Goldwasser /26/, Sue и Sytkowski /27/ и Yangawa /21/. В настоящее время не известно, представляет ли этот N-конец /Ala-Pro-Pro-Aro-/ фактический N-конец, найденный на ЭПО при кровообращении, или происходит некоторое расщепление в почке или моче.

Аминокислотные последовательности, которые подчеркнуты в Таблице 2 и 3, обозначают те триптические фрагменты или участок N-конца, для которых была получена информация белковой последовательности. Выведенная аминокислотная последовательность точно согласовывается с триптическими фрагментами, которые были секвенированы, подтверждая, что выделенный ген кодирует человеческий ЭПО.

Структура и последовательность гена ЭПО человека

Относительные положения вставок ДНК четырех независимых геномных клонов ЭПО человека показаны на Рис. 3. Гибридизационный анализ этих клонированных ДНК при помощи олигонуклеотидных зондов и различных зондов, полученных от двух классов клонов кДНК ЭПО, определил положение гена ЭПО внутри приблизительно 3,3кб области, показанной затемненной линией на фиг. 3. Полный анализ секвенирования этой области (см. Пример 4) и сравнение с клонами кДНК привели к получению карты интронной и экзонной структуры гена ЭПО, показанной на фиг. 4. Ген ЭПО разделяют на 5 экзонов. Часть экзона I, полные экзоны II, III и IV, а также экзона V содержат белок-кодирующую информацию. Оставшиеся части экзонов I и V кодируют 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности, соответственно.

Неустойчивая экспрессия ЭПО в клетках COS

Для того, чтобы наглядно показать, что биологически активный ЭПО может экспрессироваться в системе культуры клеток *in vitro*, осуществляли исследования, экспрессии в клетках COS /58/. Вектор, используемый для переходных исследований, а именно, p91023 /B/, описан в Примере 5. Этот вектор содержит основной поздний промотор аденовируса, последовательность полиадениляции SV40, SV40-начало репликации, ген-усилитель SV40 и ген VA аденовируса. Вставка кДНК в λ -HEPOF L 13 (см. Таблицу 6) была вставлена в вектор p91023 /B/ ниже основного позднего промотора аденовируса. Этот новый вектор идентифицирован как рРТФ - L 13.

Через двадцать четыре часа после трансфекции этого построения в штамм M6 клеток COS-I (Horowitz и др., T. Mol Appl. Genet 2:147 - 149 (1983)) клетки промыли, перевели в свободные от сыворотки среды, после чего клетки собрали через 48 часов. Затем с использованием количественного радиоиммунного анализа для ЭПО /55/ исследовали уровень высвобождения ЭПО в культуральную надосадочную жидкость. В отдельном эксперименте вектор, содержащий кДНК ЭПО, из λ -HEPOF L 13 был трансформирован в клетки COS-I, и среды собирали, как описано выше. ЭПО в средах был затем определен количественно любым из двух биологических анализов, проводимых *in vitro*, а именно, ³H-тримидин и CFU-E /12, 29/, и любым из двух анализов *in vitro*, а именно гипоксическая мышь и голодающая крыса /30, 31/ (см. Таблицу 9, Пример 17). Эти результаты доказывают, что биологически активный ЭПО продуцируется в клетках COS-I. Под блоттингом Western, с использованием поликлонального антитела анти-ЭПО, эритропоэтин, продуцируемый клетками COS, имеет подвижность на SDS-полиакриламидных гелях, которая идентична подвижности нативного ЭПО, полученного из человеческой мочи (Пример 8). Таким образом, распространение гликозилирования COS-I, продуцирующая ЭПО, может быть аналогичным тому, что происходит в случае нативного ЭПО.

Различные векторы, содержащие другие промоторы, также могут быть использованы в клетках COS или в других млекопитающих или эукариотических клетках. Примеры этих иных промоторов, пригодных в практике настоящего изобретения, включают ранние и поздние промоторы SV 40, генный промотор металлотинонеина мыши, промотор, обнаруживаемый в длинных концевых повторах ретровирусов птиц или млекопитающих, полиэдральный генный промотор бакуловируса и другие. Примерами других типов клеток, пригодных в практике настоящего изобретения, являются E.Coli, дрожжи, клетки млекопитающих, такие как CHO (яичник китайского хомячка), C127 (эпителий обезьяны), 3T3 (мышинный фибробласт), CV-1 (почка африканской зеленой мартышки) и клетки насекомых, такие, как клетки от *Spodoptera frugiperda* и *Drosophila melanogaster*. Эти дополнительные промоторы и/или типы клеток могут обеспечить возможность регулирования тайминга или уровня экспрессии ЭПО, продуцирующей специфичный к клеткам тип ЭПО, или роста больших количеств ЭПО-продуцирующих клеток в менее дорогостоящих, более легко контролируемых условиях.

Экспрессивная система, которая сохраняет преимущества экспрессии в млекопитающих, однако, требует меньше времени для продуцирования клеточной линии с высоким уровнем экспрессии, образуется линией клеток насекомых и ДНК-вирусом, который репродуцируется в этой клеточной линии. Вирус представляет собой вирус ядерного полиэдроза. Он имеет геном двунитевой кольцевой ДНК в 128кб. Цуклеокапсид имеет палочковидную форму и находится упакованным в двух формах, а именно, неокклюзированной форме - мембранный почкующийся вирус, и окклюзированной форме - упакован в белковый кристалл в зараженном клеточном ядре. Эти вирусы могут быть обычным путем размножены *in vitro* в культуре клеток насекомых и откорректированы для всех обычных методов животной вирусологии. Культуральные среды клеток - это обычно

питательный солевой раствор и 10%-ная фетальная телячья сыворотка *in vitro*, вирусный рост инициируется, когда неокклюдирующий вирус /НОВ/ входит в клетку и продвигается к ядру, где он реплицируется. Репликация является ядерной. В течение начальной фазы 8 - 18 часов постинфекции вирусной аппликации нуклеокапсиды собираются в ядре и впоследствии проходят через плазменную мембрану как НОВы, распространяя инфекцию по культуре клеток. Кроме того, некоторые нуклеокапсиды впоследствии (еще 18 часов постинфекции) остаются в ядре и закупориваются в белковой матрице, известной как полиэдральное внутриклеточное включение /ПВВ/. Эта форма не является инфекционной в культуре клеток. Матрица состоит из белка, известного как полиэдрин, молекулярный вес 33кд. Каждое ПВВ имеет приблизительно 1мкм в диаметре, и в ядре могут быть до 100ПВВ. Ясно, что большое количество полиэдрина продуцируется позже в цикле заражения, и оно составляет до 25% общего количества клеточного белка.

Так как ПВВ не играет роли в цикле репликации *in vitro* полиэдриновый ген может быть убран из вирусной хромосомы без какого бы то ни было влияния на жизнеспособность *in vitro*. При использовании вируса в качестве вектора экспрессии заявитель заменил область, кодирующую полиэдриновый ген, инородной ДНК, подлежащей экспрессии, поместив ее под контроль полиэдринового промотора. Это привело к вирусному фенотипу, не образующему ПВВ.

Эта система использовалась несколькими исследователями, наиболее известными из которых являются Реппокс и др. и Smith и др. (Gregory D, Penuvek, Cnaries Shoemaker и Lois K.Miller, Molecular and Cell Biology 3:84, стр. 399 – 406) сделали сообщение о высокоэффективной экспрессии бактериального белка, В-галактозидазы, когда тот помещен под контроль полиэдрилового промотора.

Другой вектор экспрессии на основе вируса ядерного полиэдроза представлен Smith и др. (Gale E. Smith, Max D. Summers и M.J. Fraser, Molecular and Cell Biology, 16 мая 1983, стр. 2155 - 2165. Авторы продемонстрировали эффективность их вектора посредством экспрессии человеческого В-интерферона. Синтезированный продукт был обнаружен гликозилированным и выделенным из клеток насекомых, как можно было ожидать. В Примере 14 описаны модификации полиэдр-гена вируса ядерного полиэдроза *Antographa Californica* /AcNPY/, которые позволяют осуществить легкую вставку гена ЭПО в плазмиду так, что он может находиться под транскрипционным контролем полиэдринового промотора. Полученную ДНК контрансфецируют с ДНК интактной хромосомы из AcNPY дикого типа в клетки насекомых. Событие генетической рекомбинации приводит к замещению области полиэдринового гена AcN PYS дезоксирибонуклеиновой кислотой из плазмиды. Полученный рекомбинантный вирус может быть идентифицирован среди вирусного потомства посредством его обладания последовательностями ДНК гена ЭПО. Этот рекомбинантный вирус при реинфекции клеток насекомых, как ожидается, и продуцирует ЭПО.

Примеры экспрессии ЭПО в СПО, С127 и 3Т3, а также в клетках насекомых представлены в Примерах 10 и 11 /СНО/ 13 /С127 и 3Т3/ и 14 (клетки насекомых).

Рекомбинантный ЭПО, полученный в клетках СНО, как в Примере 11, был очищен традиционными методами колоночной хроматографии. Относительные количества сахаров, присутствующих в гликопротеиде, анализировали двумя самостоятельными методами /1/ Reinhard Methods in Enzymol 50:244 - 249 (Метанализ) и /11/ Takemoto, Н. и др. Anal Biochem. 145:245 /1985/ (пирил-аминирование, совместно с самостоятельным определением сиаловой кислотой). Результаты, полученные каждым из этих способов, были в превосходном согласии. Таким образом было проделано несколько определений, что дало средние значения, где N-ацетил-глюкозамин для сравнительных целей дан как значение 1:

Сахар	Относительный молярный уровень
Т-Ацетилглюкозамин	1
Гексозы:	1,4
Галактоза	0,9
Манноза	0,5
N-Ацетилнейраминная кислота	1
Фукоза	0,2
N-Ацетилгалактозамин	0,1

Примечательно, что значительные уровни содержания фукозы и N-ацетилгалактозамина воспроизводимо наблюдались при использовании обоих самостоятельных методов анализа на сахар. Присутствие N-ацетилгалактозамина указывает на наличие O-сцепленного гликоилирования белка. Наличие O-сцепленного гликозилирования далее отмечалось анализом SDS-PAGE гликопротеида различными сочетаниями гликоэндных ферментов. В частности, вслед за ферментативным отщеплением всего N-сцепленного углевода на гликопротеидах с использованием эндо N-гликозидазы пептидного фермента, молекулярная масса белка еще более снижалась после последовательного переваривания нейраминидазой как определено анализом SDS-PAGE.

Биологическая активность *in vitro* очищенного рекомбинантного ЭПО была опробована методом C.Kiystalal, Exp. Nematol., 11:649 (1983) (биопроба на пролиферацию клеток селезенки) с детеринациями белка, рассчитанными на основе данных по аминокислотному составу. После многократных определений удельная активность *in vitro* очищенного рекомбинантного ЭПО была найдена составляющей более, чем 200000единиц/мг белка. Среднее значение находилось в интервале 275000 - 300000единиц/мг белка. Кроме того, также наблюдались значения выше, чем 300000. Отношение активности *in vivo* (анализ полицитемических мышей, Kazal и Ersleu, Am. Clinical Lab, Sci., Том В, стр. 91 (1975)) к активности *in vitro*, исследуемые для

рекомбинантного материала, находились в интервале 0,7 - 1,3.

Интересно сравнить представленную выше характеристику гликопротеида с характеристикой рекомбинантного СНО-производимого ЭПО, ранее изложенной в Международной заявке на патент № WO 85/02810 (опубликована 20 июня 1985 года). Аналогичный сравнительный анализ на сахар, представленный на стр. 65 данной заявки, показывает, что значение для фукозы и N-ацетилгалактозамина равны 0, тогда как отношение гексозы: N-ацетилгалактозамин равно 15,09:1. Отсутствие N-ацетилгалактозамина указывает на отсутствие O-сцепленного гликоосилирования в ранее приведенном гликопротеиде. В противоположность этому материалу охарактеризованный выше рекомбинантный СНО-производимый ЭПО настоящего изобретения содержит значительные и воспроизводимо обнаруживаемые количества как фукозы, так и N-ацетилгалактозамина, содержит менее 1/10 относительного количества гексоз и отличается наличием O-сцепленного гликоосилирования. Кроме того, высокая удельная активность вышеописанного рекомбинантного ЭПО на основе СНО может быть непосредственно связана с его отличительным признаком гликоосилирования.

Биологически активный ЭПО, полученный прокариотической или эукариотической экспрессией клонированных генов ЭПО настоящего изобретения, может быть использован для лечения *in vivo* видов млекопитающих врачами и/или ветеринарами. Количество активного компонента, безусловно, будет зависеть от жесткости режима, выбранного пути введения и удельной активности активного ЭПО, и в конечном счете будет решена лечащим врачом или ветеринаром. Такое количество активного ЭПО, определенное лечащим врачом, упоминается здесь как "эффективное для лечения ЭПО" количество. Например, при лечении индуцированной гипопролиферативной анемии, ассоциированной с хронической почечной недостаточностью в овце, эффективное суточное количество ЭПО найдено равным 10 единицам/кг в течение 15 - 40 дней. См. Eschbach и др., J.Clin.Invest., 73:434 (1984).

Активный ЭПО может вводиться любым путем, подходящим для используемых условий. Предпочтительна инъекция ЭПО в кровоток млекопитающего. Специалисту станет ясно, что предпочтительный путь введения изменяется с выбранным режимом.

В то время как активный ЭПО можно вводить как чистое или в основном чистое соединение, предпочтительно иметь его в виде фармацевтической композиции или препарата.

Композиции настоящего изобретения, как для ветеринарного, так и для человеческого применения, содержат белок активного ЭПО, как описано выше, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями его и, по выбору, другими терапевтическими средствами. Носитель (носители) может быть "приемлемым" в смысле его совместимости с другими компонентами композиции и не вредным для его реципиента. Желательно, чтобы композиция не включала окислитель и другие вещества, с которыми, как известно, несовместимы пестициды. Композиции могут быть представлены в единичной лекарственной форме и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармацевтики. Все способы включают стадию связывания активного компонента с носителем, которой составляет один или более вспомогательных компонентов. В основном, рецептуры приготавливают путем однородного и тщательного смешения активного компонента с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или с обоими, после чего, если необходимо, осуществляют формование продукта в желательную композицию.

Композиции, пригодные для парентерального введения, включает стерильные водные растворы активного компонента с растворами, предпочтительно изотоническими с кровью реципиента. Такие композиции можно приготавливать путем растворения твердого активного компонента в воде для получения водного раствора, и придание стерильности указанному раствору может достигаться в одноразовых или многоразовых контейнерах, например, запаянных ампулах или пробирках.

ЭПО/кДНК, как используется здесь, включает созревший ген ЭПО/кДНК, которому предшествует кодон ATG и ЭПО/кДНК, кодирующая аллельные вариации белка ЭПО. Один аллель проиллюстрирован в Таблицах 2 и 3. Белок ЭПО включает производное 1-метионина белка ЭПО (Met-ЭПО) и аллельные вариации белка ЭПО. Созревший белок ЭПО показан последовательностью в Таблице 2, и начинается с последовательности Ala.Pro. Pro.Arg. начало которой изображено цифрой "1" в Таблице 2. Met-ЭПО должен начинаться с последовательности Me. Ala. Pro. Pro. Arg...

Следующие примеры даны для содействия в понимании настоящего изобретения, действительный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Понятно, что в предлагаемых методах могут быть выполнены модификации в пределах сущности настоящего изобретения. Все температуры выражены в градусах по Цельсию и не откорректированы. Знаком для микрона или микро, например, микролитра, микромоля и т.д., служит "мк", например, мкл, мкм и т.д.

Примеры

Пример 1:

Выделение геномного клона ЭПО

ЭПО очищают от мочи пациентов, страдающих апластической анемией, в основном, как описано ранее (Miyake и др., J.Biol Chem., 252:5558 (1977)), с исключением того, что опускают фенольную обработку и заменяют термообработкой при температуре 80° в течение 5 минут для инактивации нейраминидазы. Конечной стадией очистки является фракционирование на колонке C-4 Vydac высокоэффективной жидкостной хроматографии (Группа Сепарации) с использованием от 0 до 95% ацетонитрального градиента с 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФК) в течение 100 минут. Положение ЭПО в градиенте определяют электрофорезом в геле и анализом N-концевой последовательностью (21, 26, 27) основных пиков. ЭПО элюируют при 53% ацетонитрила и обнаруживают приблизительно 40% белка, подвергнутого высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Фракции, содержащие ЭПО, выпаривают до 100 мкл, доводят до pH 7,0

бикарбонатом аммония, переваренного до готовности 2%-ным, ТРСК-обработанным трипсином (Worthington) в течение 18 часов при температуре 37°. Триптическое переваривание затем подвергают ВЭЖХ с обращенной фазой, как описано выше. Записывают оптическую плотность при 280 и 214нм. Хорошо отделенные пики выпаривают почти до сухости и подвергают непосредственно анализу N-концевой аминокислотной последовательности /59/, используя газофазный секвениатор Модели 480A Applied Biosystems. Полученные последовательности приведены в Таблицах 2 и 3. Как описано здесь выше, два из этих триптических фрагментов отбирают для синтеза олигонуклеотидных зондов. Из последовательности, Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-LyS (аминокислоты 46 - 52 в Таблицах 2 и 3), получают 17ме 32-кратной дегенерации

10 A A A
TTCCANGCGTAGAAGTT
и 18мег 128-кратной дегенерации
A A A
CCANGCGTAGAAGTTNAC.

15 Из последовательности, Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg (аминокислоты 144 - 150 в Таблицах 2 и 3), получают два пула 14-меров, каждый представляет собой 32-кратный дегенерат

TTGN T T и TTGN T T
TACACTAACTTCCT TACACTAACTTCTT

20 которые отличаются в первом положении лейцинового кодона.

Олигонуклеотиды помечают в 5'-конце ³²P, используя полинуклеотидную киназу (New England Biolabs) и гамма ³²P-ATP (New England Nuklear)

Удельная активность олигонуклеотидов варьируется между 1000 и 3000дьюм³/ммол олигонуклеотида.

25 Геномную ДНК-библиотеку человека в бактериофаге лямбда (Lawп. и др., 22) подвергают скринингу с использованием модификации методики амплификации in situ первоначально описанной Woo и др., /47/ (1978). Приблизительно 3,5 x 10⁵ фаза высевает с плотностью 6000 фаза на 150мм чашку Петри (среды NZCYM) и инкубируют при температуре 37° до тех пор, пока пятна не станут видимыми, однако маленькими (приблизительно 0,5мм).

30 После охлаждения при температуре 4° в течение 1 часа дубликатные реплики паттернов пятен переносят к найлоновым мембранам (New England Nuklear) и инкубируют в течение ночи при температуре 37° на чашках со свежими средами NZCYM. Затем фильтры денатурируют и нейтрализуют дотированием в течение 10 минут каждого на тонкой пленке 0,5N NaOH - 1M NaCl и 0 5M Tris /pH 8/ - 1M NaCl, соответственно. Вслед за вакуумной сушкой при температуре 80° в течение 2 часов фильтры промывают в 5 x SSC, 0,5% SDS в течение 1 часа, и точечные остатки на поверхности фильтров удаляют путем осторожного соскоба сухой тканью. Это

35 соскабливание снижает фоновое связывание зонда с фильтрами, фильтры затем промывают водой и предварительно гибридизируют от 4 до 8 часов при температуре 48° в 3M растворе тетраметиламмонийхлорида, 10мМ NaPO₄ /pH 6,8/, 5 x D-enhard's, 0,5% SDS и 10мМ ЭДТК. 17мег, меченый ³²P, затем прибавляют при концентрации 0,1пмол/мл и гибридизацию осуществляют при температуре

40 8° в течение 72 часов. Вслед за гибридизацией фильтры промывают экстенсивно в 2 x SSC (0,3M NaCl - 0.03M щитрат натрия, pH 7) при комнатной температура и затем в течение 1 часа в 3M TMACl - 10мМ NaPO₄ /pH 6,3/ при комнатной температуре и от 5 до 15 минут при температуре гибридизации. Приблизительно 120 сильных дубликатных сигналов обнаруживают в след за 2-х дневной автордиографией усиливающим экраном. Положительные сигналы отбирают, группируют в пулы из 8, перевысевают и вновь подвергают окринингу в трипликате с использованием 1/2 14мег пула на каждом из двух фильтров и 127мег на третьем фильтре. Условия и 17мег для высевания и гибридизации такие, как описано выше, за исключением того, что гибридизацию для 14мег осуществляют при температуре 37. Вслед за автордиографией зонд отводят из 17мег фильтра в 50%-ном формамиде в течение 20 минут при комнатной температуре и фильтр повторно гибридизируют при температуре 52° 18мег зондом. Два независимых фага гибридизируют ко всем трем зондам.

50 ДНК из одного из этих фагов обозначен здесь λ-NEPOF переваривают до готовности с помощью Sau3A и субклонировать в M13 для анализа ДНК-последовательности с использованием дидезокси-метода обрыва цепи, предложенного Sanger и Coulson, /23/ (1977). Нуклеотидная последовательность и выведенная аминокислотная последовательность открытой рамки считывания, кодирующей триптический фрагмент ЭПО (подчеркнутая область), описаны здесь. Интронные последовательности даны в строчных буквах, экзонные последовательности /87nt/ даны в прописных буквах. Последовательности, которая согласуются с сайтами акцептора сращивания /a/ и донора /d/, подчеркнуты. (См. Таблицу 4).

Таблица 4

agcttctgggcttcagaccagctactttgcggaactcagcaaccagggcatctctgagtctccgccaagacc
 5 gggatgccccccaggaggtgtccgggagcccagcctttcccagatagcagctccgccagtcccaagggtgcgcaa 150
 ccggctgcaactcccccccgcgacccagggcccgggagcagccccatgaccacacgcacgtctgcagcagccc
 cgtcagccccggagcctcaaccaggcgtcctgccccctgctctgaccccgggtggccccctaccctggcgacccc 300
 tcacgcacacagcctctccccccccccccgcgcagcaacatgcagataacagccccgacccccggccaga
 10 gcccragagtcctggggccacCCCGCCCGCTCGCTGCGCTGCGCCGCACCGCGCTGTCTCCCGGAGCCGGACCG 450
 GGGCCACCGCCCGCTCTGCTCCGACACCGCGCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGG
 CCTGCACCGCCGAGCTTCCCGGATGAGGGCCCCCGGTGTGGTCACCGCGCGCCCCAGGTGCGTGAGGGACC 600
 CCGGCCAGCGCGGAGATGGGGGTGCACGgtgagtactcgcgggctgggcgctcccggcccggggtccctgtt
 15 MetGlyValHisG
 tgagcggggatattagcggccggctattggccaggaggtggctgggtccaaggaccggcgacttgtaaggacc 750
 cggaagggggaggggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaac
 20 ctgacctgtgaaggggacacagtttgggggttgaggggaagaaggtttggggggttctgctgtgccagtgggag 900
 gaagctgataagctgataacctgggcgctggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccagg
 attgaagtttggccggagaagtggatgctggttagcctgggggtggggtgtgcacacggcagcagattgaatgaa 1050
 25 ggccagggagggcagcactgagtgttgcattggttggggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatg
 aaggaaactgtccttccacagccaccctctcccccccgcctgactctcagcctggctatctgttcttagAATGT 1200
 CCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGGCTCCCTCTGGCCCTCCAGTCTCTGGCGCCCC^{luCys}ACCACGC
 ProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSerLeuProLeuGlyLeuProValLeuGlyAlaProProArg
 30 CTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGCAGAGGTACCTCTTGGAGCCAAGGAGCCGAGAATATCACGgtgagacc 1350
 LeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLysGluAlaGluAsnIleThr
 cttccccagcncattccacagaactcagctcagggttcagggaactcctcccagatccaggaacctggcactt
 ggtttgggggtggagttgggaagctagacactgccccctacataagaataagctcgggtggccccaaccatacct 1500
 35 ggaaactaggcaaggagcaaaagccagcagatcctacgectgtggccagggccagagccttcagggacccttgact
 ccccgggctgtgtgcatttcagACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCAGACAC 1650
 ThrGlyCysAlaGluHisCysSerLeuAsnGluAsnIleThrValProAspTh
 CAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGgtgagttccttttttttttttttttctttcttttggagaat
 40 rLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgMetGlu
 ctcatattgcgagcctgattttggatgaaagggagaatgatcgagggaaaggtaaaatggagcagcagagatgagg 1800
 ctgcctggggcgcagaggctcacgtctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccctgg
 45 agtttcagaccaacctaggcagcatagtgagatccccatctctacaaacatttaaaaaaattagtcaggtgaag 1950
 tgggtgatggtggttagtcccagatatttggaggctgagggcgggaggatcgcttgagcccaggaatttgaggctg
 cagtgagctgtgatcacaccactgcactccagcctcagtgacagagtgaggecctgtctcaaaaaagaaaagaaa 2100
 50 aaagaaaaatnaatgagggtgtatggaatacgttcattattcattcactcactcactcattcattcattca
 ttcatcaacaagtcttattgcatacctctgtttgctcagcttgggtgcttggggctgctgaggggcaggagggga 2250

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

gagggtgacatccctcagctgactcccagagtcactccctgtagCTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAG
ValGlyGlnGlnAlaValGluValTrpGln
GGCCTGGCCCTGCTGTCCGGAAGCTGTCTCGGGGCCAGGCCCTGTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCC 2400
GlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeuLeuValAsnSerSerGlnProTrpGluPro
CTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCACCTCTGCTTGGGGCTCTGGGAGCCCAG
LeuGlnLeuHisValAspLysAlaValSerGlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGln
gtgagtaggagcggacacttctgcttgcctttctgtaagaaggggagaagggctcttgctaaggagtacaggaac 2550
tgtccgtattccttccctttctgtggcactgcagcgacctcctgttttctccttggcagAAGGAAGCCATCTCCC
LysGlyAlaIleSerP
CTCCAGATGGGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACT 2700
roProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLysLeuPheArgValTyrS
CCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGT
erAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArg
CCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACCAACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCGGCCACTCCTGAACCCCG 2850
TCCAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCAGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGA
GGAACTGTCCAGAGAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCAACTTGAGGGCCAGAGCAGGAAGCATT 3000
CAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATGCTGGGAAGACGCCTGAGCTCACTCGCCACCCTGCAAAATT
TGATGCCAGGACACCGTTTGGAGGGGATTTACCTGTTTTCCGACCTACCATCAGGGACAGGATGACCTGGAGAAC 3150
TTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAGGTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACAC
CGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGCTGGCCTCTGGCTCTCATGGGGTCCAAGTTTGTGTATTCT 3300
TCAACCTCATTGACAAGAAGTCAAACCAACcaatatgactcttggcttttctgttttctgggaacctcccaatccc
ctggctctgtcccactcctggcagca 3400

Пример 2: Northern анализ мРНК человеческой плодной печени

5мкг мРНК человеческой фетальной печени (получена из 20-недельной фетальной печени) и мРНК печени взрослого подвергают электрофорезу в 0,8%-ном агарозном формальдегидном геле и переносят к нитроцеллюлозе, используя метод Denman и др., Cell, 23:731 (1981). Однонитевый зонд затем получают из матрицы M13, содержащей вставку, показанную в Таблице 1. Праймером является 20мер, происходящий из того же триптического фрагмента, что и первоначальный 17мер зонд. Зонд получают, как ранее описано Anderson и др., PNAS, /50/ (1984), за исключением того, что вслед за отщеплением (который продуцирует желательный зонд длиной 95nt, содержащий 74nt кодирующей последовательности) малый фрагмент очищают от матрицы M13 хроматографией на колонке с Сефарозой С14В и 0,1N NaOH - 0,2M NaCl. Фильтр гибридизируют приблизительно до 5×10^6 отсчетов в минуту этого зонда в течение 12 часов при температуре 68°, промывают в 2 x SSC при температуре 68° и подвергают воздействию в течение 6 дней усиливающего экрана. Однонитевая маркерная мРНК из 1200nt (указана стрелкой) движется в примыкающем проходе. (Фиг. 1).

Пример 3:

кДНК фетальной печени

Зонд, идентичный описанному в Примере 2, получает и используют для скрининга библиотеки кДНК фетальной печени, полученной в векторе λ -Ch21A (Toole и др., Nature, /25/, (1984), используя стандартные методики скрининга пятом (Berten Davis, Science, /54/ (1978). Три самостоятельных положительных клон (обозначены здесь λ -HEPOF L 6 (1350 пар оснований), λ -HEPOF L 8 (700 п.о.) и λ -HEPOF L 13 (1400п.о.) выделяют вслед за скринингом 1×10^6 пятен. Полная вставка λ -HEPOF L 13 и λ -HEPOF L 6 секвенируется вслед за субклонированием в M13. (Таблицы 7 и 5, соответственно). Только части λ -HEPOF L 8 секвенируют, оставшиеся подразумеваются идентичными другим двум клонам. (Таблица 7). 5'- и 3'-нетранспирируемые последовательности представлены строчными буквами. Кодирующая область представлена прописными буквами.

Таблица 5

gacaggaag gacgagctgg gacagagacg tg88gatgaa

5 ggaagctgtc ctccacagc caccctctc cctccccgc tgactctcag cctggctatc tgtttctagAA LU CYS PRO
TGT CCT

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC

10 J SH 10 20
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG

15 * SH 30 SH 40
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
GAG GCC GAG AAT ATC ACG ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT

50 60
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG CAG CAG GCC

20 70 80
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC CTG

25 * 90 100
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG CAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT

110 120
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
GCC CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT CCG GCT CTG GGA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TCC

30 130 140
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
CCT CCA GAT CCG GCC TCA GCT CCT CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA

150 160
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GAG GCC

35 SH 166
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
TGC AGG ACA GGG GAC AGA TGA ccaggtg tgtccacctg ggcataatcca ccacctccct caccaacatt

gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct gaaccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc

40 ccatggacac tccagtgcc gcaatgacat ctcaggggcc agaggaactg tccagagagc aactctgaga

tctaaggatg tcacagggcc aacttgaggg cccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag

ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctcactcggc accctgcaaa atttgatgcc aggacacgct

45 ttggaggcga tttacctgtt ttcgcacctc ccatcagggc caggatgacc tggagaactt aggtggcaag

ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcaactccctt ggtggcaaga gcccccttga caccggggtg

gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg gcctctgget ctcatggggt ccaagttttg tgtattcttc

50 aacctcattg acagaaactg aaaccacca aaaaaaaaaa

Таблица 6

У А 4 4 8 8 2 С 2

У А 4 4 8 8 2 С 2

	ctcgctgcgc	tgcgccgcac	cgcgctgtcc	tccccggagcc	ggaccggggc	caccgcgcc	gctctgctccg	acaccgcgcc												
5	ccctggacag	ccgcccctctc	ctccaggccc	gtggggctgg	ccctgcaccg	ccgagcttcc	cgggatgaggg	ccccgggtgt												
	ggtcaccccg	cgcgccccag	gtcgctgagg	gacccccgcc	aggcgcggag	MET	GLY	VAL	HIS	GLU	CYS	PRO								
						ATC	GGG	GTG	CAC	GAA	TGT	CCT								
10	ALA	TRP	LEU	TRP	LEU	LEU	LEU	SER	LEU	LEU	SER	LEU	PRO	LEU	GLY	LEU	PRO	VAL	LEU	GLY
	GCC	TGC	CTG	TGG	CTT	CTC	CTG	TCC	CTG	CTG	TGC	CTC	CCT	CTG	GGG	CTC	CCA	GTC	CTG	GCC
	1					SH				10										20
	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys
	GCC	CCA	CCA	CGC	CTC	ATC	TGT	GAC	AGC	CGA	GTC	CTG	GAG	AGG	TAC	CTC	TTG	GAG	GCC	AAG
15			*					SH		30			SH				*			40
	Glu	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile	Thr
	GAG	GCC	GAG	AAT	ATC	ACG	ACG	GCC	TGT	GCT	GAA	CAC	TGC	AGC	TTG	AAT	CAG	AAT	ATC	ACT
										50										60
20	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
	CTC	CCA	GAC	ACC	AAA	GTT	AAT	TTC	TAT	GCC	TGG	AAG	AGG	ATG	GAG	GTC	GGG	CAG	CAG	GCC
										70										80
	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
	GTA	GAA	GTC	TGG	CAG	GCC	CTG	GCC	CTG	CTG	TGC	GAA	GCT	GTC	CTG	CGG	GCC	CAG	GCC	CTG
25			*							90										100
	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser
	TTC	GTC	AAC	TCT	TCC	CAG	CCG	TGG	GAG	CCC	CTG	CAG	CTG	CAT	CTG	GAT	AAA	GCC	GTC	ACT
										110										120
30	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
	GCC	CTT	CGC	ACC	CTC	ACC	ACT	CTG	CTT	CGG	GCT	CTG	GGA	GCC	CAG	AAG	GAA	GCC	ATC	TCC
										130										140
35	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys
	CCT	CCA	GAT	GCG	GCC	TCA	GCT	GCT	CCA	CTC	CGA	ACA	ATC	ACT	GCT	GAC	ACT	TTC	CGC	AAA
										150										
	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	
	CTC	TTC	CGA	GTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGG	GCA	AAG	CTG	AAG	CTG	TAC	ACA	GGC	GAG	

Таблица 7

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

ccccggagcc ggaccgggggc caccgcgccc gatctgctccg acaccgcgcc

5 cccctggacag cgcacctctc ctcccaggecc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgaggg cccccggtgt

ggtcacccegg cgcgccccag gtcgctgagg gacccccggcc aggcgcggag

10 ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTC TCC CTG CTG TCC CTC CCT CTG GCC CTC CCA GTC CTG GGC

15 1 SH 10 20
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG

20 * SH 30 SH * 40
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
CAG CCC CAG AAT ATC ACG ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT

25 50 60
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG CAG CAG GGC

70 80
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTC GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTC CGG GGC CAG GCC CTC

30 * 90 100
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Glu Leu His Val Asn Lys Ala Val Ser
TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC ACT

110 120
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
GGC CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TCC

35 130 140
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA

40 150 160
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CGG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC

45 SH 166
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
TCC AGC ACA GCC GAC AGA TGA ccagggtg tgtccacctg ggcatatcca ccacctcect caccnacatt

gcttggtgeca caccctcccc cgcacctcct gaacccegtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc

50 ccatggacac tccagtgeca gcaatgacat ctccaggggc agaggaactg tccagagagc aactctgaga

ctcaggatg tccagggccc aacttgaggg cccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaactcag

ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctccactcggc accctgcaa atttgatgcc aggacagct

ctggaggcga tttacctgtt ttcgcacctc ccatcaggga caggatgacc tggagaactt aggtggcaag

ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gcactccett ggtggcaaga gcccccttga caccggggtg

gtgggaacca tgaagncagg atgggggctg gcctctggct ctcatggggt ccaagttttg tgtattcttc

55 acctcattg acaagaactg aaaccaccaa aaaaaaaaaa

60 В отношении Таблиц 2 и 3 следует упомянуть, что выведенная аминокислотная последовательность, показанная ниже нуклеотидной последовательности, пронумерована, начиная с цифры для первой аминокислоты созревшего белка. Мнимый лидерный пептид указан во всех верхушках для аминокислотных обозначений. Остатки цистерна в созревшем белке дополнительно указаны SH, и потенциальные N-оцепленные сайты гликозилирования обозначены звездочкой. Аминокислоты, которые подчеркнуты, отмечают те остатки, идентифицированные секвенированием N-концевого белка или секвенированием триптических фрагментов ЭПО, которые описаны в Примере 1. Частичное подчеркивание указывает на остатки в аминокислотной последовательности определенных триптических фрагментов, которые не могли быть определены однозначно.

65 кДНК-клоны λ-NEPOF L 6, λ-NEPOF L 8 и λ-NEPOF L 13 депонированы и доступны из American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, под входящими номерами ATCC 40156, ATCC 40152 и ATCC 40153, соответственно.

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

Пример 4:

Геномная структура гена ЭПО

Относительные размеры и положения четырех самостоятельных геномных клонов (λ -HEPO1, 2, 3 и 6) из библиотеки Haelll/AluI проиллюстрированы перекрывающимися линиями на Фиг. 3. Утолщенная линия указывает положение гена ЭПО. Масштаб (в Кб) и положения известных сайтов расщепления эндонуклеазами рестрикции приводятся. Область, содержащая ген ЭПО, подлостью секвенирована из обеих тяжей с использованием направленных экзонуклеаза III-генерированных рядов делеций через эту область. Схематическое изображение пяти экзонов, кодирующих мРНК ЭПО, показано на фиг. 4. Точная 5'-граница экзона 1 в настоящее время неизвестна. Белок - кодирующее участки экзонов затемнены. Полная нуклеотидная последовательность экзонов показана в Таблице 4. Известные пределы каждого экзона очерчены сплошными вертикальными полосами. Геномные клоны λ -HEPO1, λ -HEPO2, λ -HEPO3 и λ -HEPO6 деполерированы и доступны из American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, под входящими номерами ATCC 40154, ATCC 40155, ATCC 40150 и ATCC 40151 соответственно.

Пример 5:

Конструирование вектора p91023 /B/

Вектором трансформации является pAdD26sVpA /3/, описанный Kaufman и др., Mol. Cell Biol., 2:1304 (1982). Конструкция этого вектора показана на фиг. 5А. Короче говоря, эта плаزمида содержит кДНК-ген дигидрофолатредуктазы мыши /DFNFI/, который находится под транскрипциональным контролем основного позднего промотора аденовируса 2 /Ad2/. 5'-сайт срачивания указан в аденовирусной ДНК, и 3'-сайт срачивания, происходящий от гена иммуноглобулина, присутствует между основным поздним промотором аденовируса 2 и DFHP-кодирующей последовательностью. Ранний сайт полиаденилирования sV40 присутствует по направлению ниже от DFHP-кодирующей последовательности. Участок прокариотического происхождения pAdS26SvpA /3/ исходит от psVod/Mellon и др., Cell, 27:279 (1981) и не содержит последовательности pBR322, известные тем, что они ингибируют репликацию в клетках млекопитающих (Lusky и др., Nature, 293:79 (1981)) pAdD26 pA /3/ превращают в плазмиду pCVSV L 2, как показано на фиг. 5А pAdD26VS pA /3/ превращают в плазмиду pAdD26 SvpA /3/ /d/ деленной одного из двух сайтов Psti в плазмиде pAdD26 SvpA /3/. Это осуществляют путем частичного переваривания Psti, используя недостаточность фермента таким образом, что получают субпопуляцию линейаризованных плазмид, в которой только один сайт Psti расщеплен, о последующей обработке ферментом Кленова, сшиванием для рециркуляризации и скринингом для делеции сайта Psti, расположенного 3' к полиадениляционной последовательности SV10.

Трех раздельный лидер аденовируса и гены, ассоциированные с вирусом (YA гены), вставляют в плазмиду pAdD26SVpA/3/ /d/, как показано на фиг. 5А. Во-вторых pAdD26SVpA/3/ /d/ расщепляют PvuII для создания линейной молекулы, открытой внутри 3'-части трех элементов, содержащих трехраздельный лидер. Затем pJAW 43 (Zatn и др., Cell, 16:851 (1979)) переваривают XhoI, обработанным фрагментом Кленова, переваривают PvuII, и фрагмент из 140 п.о., содержащий вторую часть третьего лидера, выделяют электрофорезом в акриландо геле /6/ в буфере бората Tris; Maniatis и др., выше. Фрагмент 140п.о. затем сшивают с PvuII-переваренной плазмидой pAdD26SVpA/3/ /d/. Продукт сшивания используют для трансформации E.coli в устойчивость к тетрациклину, и колонии подвергают окринингу о использованием методики Gruustein - Hoghess, применяя зонд, меченый ³²P, гибридизирующий к Фрагменту из 140п.о. ДНК получают из положительно гибридизирующих колоний для испытания того, является ли реконструированный сайт PvuII 5'-или 3' - вставленной ДНК из 140п.о., специфичной ко второму и третьему поздним лидерам аденовируса. Правильная ориентация сайта PvuII - на 5'-стороне вставки 140п.о. Эта плаزمида обозначена ttpL на фиг. 5.

Фрагмент Ava II D вируса SV40, содержащего последовательность энхансера SV40, получают путем переваривания ДНК SV40 фрагмента Ava II. затупления концов фрагментом Кленова PstI, сшивания Xho 1-линкеров с Фрагментами, переваривания Xho 1 для открывания сайта Xho 1 и выделения четвертого, наибольшего фрагмента /D/ посредством электрофореза в геле. Этот фрагмент затем сшивают с pTPL разрезом Xho 1, получая плазмиду pCYSYL 2-TPL. Ориентация фрагмента DSV10 в pCYSYL 2-TPL такова, что поздний промотор вируса SV40 находится в такой же ориентации, что и основной поздний промотор аденовируса.

Для интродуцирования генов, связанных с аденовирусом /генов YA/, в pCYSYL 2-TPL, вначале конструируют плазмиду pBP322, которая содержит фрагмент в Hind III аденовируса типа 2. ДНК аденовируса типа 2 переваривают Hind III и фрагмент B выделяют электрофорезом в геле. Этот Фрагмент вставляют в плазмиду pBP322, которая предварительно была переварена Hind III. После трансформации E.coli в устойчивость к ампициллину рекомбинанты подвергают скринингу для вставки фрагмента B Hind III, и вставленную ориентировку определяют путем переваривания рестрикционным ферментом.

pBP322 - Ad Hind III B содержит фрагмент B Hind III аденовируса типа 2 в ориентации, изображенной на фиг. 5B.

Как показано на фиг. 5B, гены VA удобно получает из плазмиды pBP322 - Ad Hind III B путем переваривания Hpa I, добавления линкеров EcoRI и переваривания EcoRI о последующим восстановлением фрагмента 1,4кб. Фрагмент, имеющий липкие концы EcoRI, затем вшивают в EcoRI-сайт PTL, ранее переваренной EcoRI. После трансформирования HBIOI E.coli и отбора для устойчивости к тетрациклину, колонии подвергают скринингу посредством фильтр-гибридизации в ДНК, специфичную для генов VA. ДНК получают из положительно гибридизирующих клонов и охарактеризовывают перевариванием рестрикционной эндонуклеазой. Полученная плазмиды обозначена p91023.

Как показано на фиг. 50, два сайта EcoRI в плазмиде p91023 отщепляют путем разрезания p91023 до

готовности при помощи EcoRI, восстановления двух ДНК-фрагментов, один около 7кб и другой около 1,3кб. Последний фрагмент содержит гены УА. Концы обоих фрагментов заполняют с использованием фрагмента Кленова P_{ol}I и два фрагмента затем сшивают один к другому. Плазмиду р91023/А/ содержащую гены УА и являющуюся аналогичной плазмиде р91023, однако потерявшую интерстициальный фрагмент для двух сайтов EcoRI, идентифицируют посредством скрининга Grunstein - Hogness фрагментов гена УА, а также традиционного анализа рестрикционного соайта.

Один Pst 1-сайт в плазмиде р91023/А/ отщепляет и заменяют на EcoRI-сайт. р91023/А/ разрезают до готовности при помощи Pst_i и обрабатывают фрагментом Кленова P_{ol}I для генерации прорастающих концов. EcoRI-линкеры сшивают с тупоконечным сайтом Pst_i плазмиды р91023/А/. Линейную плазмиду р91023/А/ о EcoRI-линкерами, присоединенными в тупоконечном сайте Pst_i, отделяют от несшившихся линкеров и переваривают до готовности EcoRI, после чего повторно сшивают. Плазмиду р91023/В/, как изображено на фиг. 5С, восстанавливают и идентифицируют как имеющую структуру, аналогичную плазмиде р91023%/А/, но вместо прежнего сайта Pst_i содержится сайт EcoRI. Плаزمида р91023/В/ депонирована и доступна из American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, под входящим номером ATCC 39754.

Пример 6.

кДНК-клоны (λ -EPOF L 6 и λ -EPOF L 13, Пример 3) вставляют в плазмиду р91023/В/, образуя рРТФ L 6 и рFT F L 13, соответственно. 8мкг каждой из очищенных ДНК затем используют для трансфекции 5×10^6 клеток COS, используя DEAE-декотран-метод (ниже). Через 12 часов клетки промывают и обрабатывают Хлорохином (0,1мМ) в течение 2 часов, промывают вновь и выдерживают в течение 24 часов в 10мл средах, содержащих 10%-ную фетальную телячью сыворотку. Среда меняют на 4мл среды, свободные от сыворотки, и собирают через 48 часов.

Получение иммунологически активного ЭПО определит количественно радиоиммунным анализом, как описано Sherwood и Glodwasser /55/. Антитело поставлено Доктором Judith Sherwood. Кодированный изотопный индикатор получают из гомогенного ЭПО, как описано в Примере 1. Чувствительность пробы составляет приблизительно 1нг/мл. Результаты приводили ниже в Таблице 8.

Вектор	Уровень ЭПО, высвобожденного в среды /нг/мл/
рРТР L 13	330
рРТФ L 6	31

FTT L 13 депонирована и доступна из American Type Culture Collection, Rockville, Maryland под входящим номером ATCC 39990.

Пример 7,

кДНК ЭПО (λ -HEPOF L 13) вставляют в плазмиду р91023 /В/, трансформируют в клетки COS-1 и собирают, как описано выше (Пример 6), за исключением того, что хлорохиновую обработку опускают.

Биологически активный *in vitro* ЭПО измеряют с использованием либо колониеобразующей пробы о клетками фатальной печени мыши в качестве источника CFV-E, либо пробы поглощения ³H-тимидином, используя клетки селезенки от мышей, инъецированных фенилгидразином. Чувствительности этих анализов составляют приблизительно 25мЕдиниц/мл. Биологически активный *in vitro* ЭПО измеряют с использованием либо метода гипоксической мыши, либо метода голодающей крысы. Чувствительность этих анализов составляет приблизительно 100мЕдиниц/мл. Никакой активности не обнаружено ни в одном из этих опытов с имитированной кондиционированной средой. Результаты ЭПО, экпрессированного клоном EPOF L 13, показаны ниже в Таблице 9, где приведенные активности выражены в единицах/мл, с использованием торгового, количественно определенного ЭПО (Тоубо, 1 пс.) в качестве стандарта.

ЭПО, выделенный из клеток COS, трансфекцированных кДНК ЭПО, тип 1			
	Проба	Активность	
	RIA	100	н/мл
	CFV-E	2	0,5 Ед/мл
	³ H-Thy	3,1	1,8 Ед/мл
	гипоксическая мышь	1	Ед/мл
	голодающая крыса	2	Ед/мл

Пример 8: Гель-анализ полиакриламида SDS ЭПО из клеток COS 180нг ЭПО, высвобожденного в среды клеток COS, трансфекцированных кДНК ЭПО (λ -HEPOF L 13) в векторе 91023 /В/ (выше), подвергают электрофорезу на 10%-ном геле полиакриламида Laemlli SDS и электропередают нитроцеллюлозной бумаге (Towbin и др., Proc. Nati. Acad Sci США, 76:4350 (1979)). Фильтр зондируют антителом анти-ЭПО, как описано в Таблице 8, промывают и повторно зондируют белком А ¹²⁵I-стаф. Фильтр автордиографируют в течение двух дней. Нативный гомогенный ЭПО описан в Примере 1, и его подвергают электрофорезу или перед (проход В), или после йодирования (проход С) (см. Фиг. 6). Используемые маркеры включают метионин, меченый ³⁵S, сывороточный альбумин (68000д) и яичный альбумин (45000д).

Пример 9:

Конструирование RKI-4

Фрагмент Bam HI-PvuII из плазмиды PSV2 НГР (Subramani и др., Mol. Cell. Biol. 1:854 – 864 (1981)), содержащий ранний промотор sV40, смежный с гном дигидрофоллятредуктазы мыши (DHFR), энхансер sV40, малый антигенный интрон t и последовательность полиаденилирования SV40 выделяют (фрагмент А).

Оставшиеся Фрагменты получают из вектора p91023/A/ (выше) следующим образом, p91023/A/ переваривают PstI в единственном сайте PstI около промотора аденовируса для линейаризации плазмиды, и либо сшивают с синтетическими конвертерами Pst I - EcoRI и рециркулизируют (создавая сайты Pst I EcoRI – Pst I в первоначальном сайте Pst I; 91023/B//, либо обрабатывают большим фрагментом ДНК-полимеразы I для разрушения сайтов Pst I и сшивают с синтетическим EcoRI -линкером и рециркулизируют (создавая EcoRI-сайт в первоначальном сайте Pst I; 91023/B/. Каждую из двух полученных плазмид 91023/B/ и 91023/B'/ переваривают хба и ECOR1 для получения двух фрагментов (F и G). Путем соединения фрагмента G из плазмиды p91023/B/ и фрагмента F из плазмиды p91023/B', а также фрагмента G из плазмиды p91023/B/ и фрагмента F из плазмиды p91023/B'/ создают две новые плазмиды, которые содержат либо сайт EcoRI – Pst I, либо сайт PstI - EcoRI, где Pst I - сайт, являющийся наиболее близким к основному позднему промотору аденовируса назван p91025/C/.

Вектор p91023/C/ переваривают XhoI до готовности, и полученную линейаризованную ДНК с липкими концами затупляют путем реакции наполнения концов большим фрагментом E.coli ДНК-полимеразы I. К этой ДНК пришивают фрагмент Hind III - EcoRI из 340п.с., содержащий энхансер sV40, полученный следующим образом:

Фрагмент Hind III - PvuII из вируса sV40, который содержит основу sV40 или репликации, а также энхансер вставляют в плазмиду в lac/Little и др., Mol. Biol. Med., 1:473 - 488 (1983)). Вектор с lac получают перевариванием ДНК с lac с BamHI, наполнением липкого конца большим фрагментом ДНК-полимеразы I и перевариванием ДНК Hind III. Полученная плазида (с sVHPlac) регенерирует BamHI-сайт путем сшивания с тупым концом Pvu II. Фрагмент EcoRI-Hind III получают из с sVHPlac и пришивают к фрагменту EcoRI - Hind III P sVod/Mellon и др., выше), который содержит плазмидную основу репликации, и отбирают полученную плазмиду pVHPod. Затем получают фрагмент EcoRI – Hind III из 340п.о. плазмиды PSVHPod, содержащий основу SV40 (энхансер, затупляют с обоих концов при помощи большого фрагмента ДНК-полимеразы I и сшивают с XhoI-переваренным, тупоконечным вектором p91023/C/, описанным выше. Полученную плазмиду /p91023/C/ (Xho) плюс EcoRI/Hind III/тупая основа SV40 плюс энхансер/, в которой ориентация фрагмента Hind III -EcoRI такова, что BamHI-сайт внутри фрагмента является близлежащим к гену VA, называют pES105. Плазмиду PES105 переваривают BamHI и Pvu II, а также отдельно PvuII, и выделяют Фрагмент BamHI – Pvu II, содержащий основной поздний промотор аденовируса (фрагмент В), и фрагмент Pvu II, содержащий плазмиду в течение периода устойчивости гена (устойчивости к тетрациклину), а также другие последовательности (фрагмент С), Фрагменты А, В и С сшивают и полученную плазмиду, показанную на фиг. 7, выделяют и обозначают РК1-4. Плазида РК1-4 депонирована American Culture Collection Rockville, Maryland, где она доступна под входящим номером ATCC 39940.

Пример 10:

Экспрессия ЭПО в клетках CHO - Метод 1

ДНК (20мкг) из плазмиды pPTF L 13, описанной выше (Пример 5), отщепляют рестрикционной эндонуклеазой Cla I для линейаризации плазмиды и сшивают с Cla I-отщепленной ДНК из плазмиды pAdD265sVp/A/ I (2мкг), которая содержит интактный ген дигидрофоллятредуктазы (DHFR), приводимый в действие основным поздним промотором аденовируса Kaufman и Sharp, Mol. and Cell Biol., 2:1304 - 1319 (1982)). Эту сшитую ДНК используют для трансфекции D HF R-отрицательных клеток CHO (DUKX-BII, Chasin L.A. и Urlab G. (1980) PNAS 77:4216 - 4220/, и после двухдневного выращивания клетки, которые приняли в себя по крайней мере один ген D HF R, отбирают в альфа-средах, не имеющих нуклеотиды, и пополняют 10%-ной диализированной фотальной бычьей сывороткой. Вслед за ростом в течение двух недель в избирательных средах, колонии извлекают из первоначальных чашек, объединяют по группам из 10 - 100 колоний на пул, повторно высевает выращивают до слияния в альфе-средах, не имеющих нуклеотиды. Отстоявшиеся среди из пулов, выращенных до метотрексатной селекции, опробуют на ЭПО посредством радиоиммуноанализа (RIA). Пулы, которые показывают положительное ЭПО-получение, выращивают в присутствии метотрексата (0,02мкМ) и затем субклонированный из пула Cla 4,4,02 ЭПО, высвобождает 460нг/мл ЭПО в среды, содержащие 0,02мкМ МТХ (Таблица 10). Cla 4 4,02 - 7 ЭПО представляет собой клеточную линию выбора для получения ЭПО и депонирован American Type Culture Collection под входящим номером ATCC CRL 8695. Этот клон подвергают поэтапному отбору при возрастающих концентрациях МТХ и, по-видимому, он будет продуцировать клетки, которые обнаруживают даже более высокие уровни содержания ЭПО. Для пулов, которые являются отрицательными при RIA, метотрексат-устойчивые колонии, полученные из эквивалентных культур, растущих в присутствии метотрексата (0,02мкМ), вновь подвергают проверке в пулах для ЭПО путем RIA. Те культуры, которые не являются положительными, субклонируют и подвергают культивированию при еще более возросших концентрациях метотрексата.

Ступенчатая селекция с метотрексатом (МТХ) достигается повторными циклами культивирования клеток в присутствии возрастающих концентраций метотрексата и селекции для выживших микроорганизмов. При каждом цикле ЭПО измеряют в надосадочном слое культуры посредством RIA и биологической активности in vitro. Уровни используемого метотрексата в каждой ступенчатой амплификации составляют 0,02мкМ, 0,1мкМ и 0,5мкМ. Как показано в Таблице 10, после первого цикла селекции при 0,02мкМ МТХ в культуральные среды высвобождаются значительные уровни ЭПО.

Таблица 10
Уровень высвобождаемого в среды ЭПО

Выборка	Анализ	Сбор в α -среде	0,02мкМ метотрексат в α -среде
4 4 Пул	RIA	17нг/л	50нг/мл
4 4 Клон единичной колонии (0,02 – 7)	RIA	-	460нг/мл

5 Пример 11: Экспрессия ЭПО в клетках СПО - Метод 11

ДНК из клона λ -NEPOF L 13 переваривают EcoRI, и малый Фрагмент RI, содержащий ген ЭПО, субклонировать в EcoRI-сайт плазмиды RKI-4 (см. Пример 10). Эту ДНК (RKF L 13) пат используют для трансфекции DHF R-отрицательных клеток CHO прямо (без переваривания), и селекцию и амплификацию осуществляют, как описано в Примере 10 выше.

10 ДНК RKF L 13 также вставляют в клетки CHO путем слияния протопластов и микроинъекции. Плазмиды RKF L 13 депонирована и доступна из American Type Culture Collection Rokville, Maryland, под входящим номером ATCC 33989.

15

Уровень высвобождаемого в среды ЭПО			
Выборка	Анализ	Сбор в α -среде	0,02мкМ метотрексат в сборке в α -среде
Колония	RIA	3нг/мл	42нг/мл (пул)
Пул А			150нг/мл (клон)
	³ H-Thy	-	1,5Ед/мл
клон единичной колонии (0,02С-Z)	RIA	-	90нг/мл
	³ H-Thy	-	5,9Ед/мл
Микроинъек-цированный пул (DEPO-I)	RIA	60нг/мл	160нг/мл
	³ H-Thy	1,8Ед/мл	--

20

25 Предпочтительный клон единичной колонии депонирован и доступен American Type Culture Collection Rokville, Maryland, под входящим номером ATCC CRL 8695.

Пример 12:

Экспрессия гоночного клона ЭПО в клетках COS-I

30 Лектором, используемым для экспрессии геномного клона ЭПО, является psVOd (Mellon др., выше). ДНК из psVD (переваривают до готовности при помощи Hind III и затупляет большим фрагментом ДНК-полимеразы I. Геномный клон ЭПС, λ -NEPC3, переваривают до готовности EcoRI и Hind III, и 4,0кб фрагмент, содержащий ген ЭПО, выделяют и затупляет, как описано выше. Нуклеотидная последовательность этого фрагмента из Hind III-сайта до области, находящейся выше сигнала полиадениляции, показана на фиг. 4 и в Таблице 4. Фрагмент гена ЭПО вставляют в плазмидный Фрагмент psVOd, и правильно построенные рекомбинанты в обеих ориентирах выделяют и проверяют. Плаزمиды CSS-I имеет ген ЭПО и ориентации "а" (т.е. с 5'-концом ЭПО, самым ближайшим к началу SV40) и плазмиды CZI-3 находится в противоположной ориентации (ориентация "б").

40 Плазмиды CZI-3 и CZ2-I трансекцируют в клетки COS-I как описано в Примере 7, и среды собирают и анализируют на иммунологически реактивный ЭПО. Приблизительно 31нг/мл ЭПО обнаружено в отстоявшихся культурах от CZ2-I и 12 - 31нг/мл от CZI-3.

Геномные клоны NEPO1, NEPO2 и NEPO6 могут быть вставлены в клетки COS для экспрессии аналогичном образом.

Пример 13:

45 Экспрессия в клетках C127 и 3Т3 Конструирование рВРУЕРО

Плазмиду, содержащую кДНК-последовательность ЭПО под транскрипциональным контролем металлотионеинового промотора мыши и привязанную к полной ДНК вируса бычьей папилломы, получают следующим образом:

рEF049f

50 Плазмиды S P6/5 приобретена у Promeda Biotec. Эту плазмиду переваривают до готовности с EcoRI, и фрагмент EcoRI из 1340 п.о. из λ -NEPOF L 13 вставляют при помощи ДНК-лигазы. Полученную плазмиду, в которой 5'-конец гана ЭПО является ближайшим к промотору SP6 (как определено перевариванием BglI и Hind III), обозначают рEP049F. В этой ориентации сайт BamHI в полидинкере PSP6/5 непосредственно примыкает к 5'-концу гена ЭПО.

55 рММТнес BPV

Плазмиду рdBPV-ММТнео (342 – 12) (L aw и др., Mol. and Cell Biol., 3:2110 - 2115 (1983)), показанную на фиг. 8, переваривают до готовности BamHI для получения двух фрагментов большого фрагмента ; 8кб в длину, содержащего геном ВРУ, и меньшего фрагмента, ; 6,5кб в длину, содержащего рML2 начало репликации и ампициллин-устойчивого гена, металлотионеинового промотора, неомицин-устойчивого гена и сигнала полиаденилирования SV40. Переваренную ДНК рециркулируют ДНК-лигазой, и плазмиды, которые содержат только 6,8кб фрагмент, идентифицируют перевариваниями рестрикционными эндонуклеазами EcoRI и BamHI. Одна такая плазмиды обозначена рММТнео BPV.

рEP015a

60 рММТнео BPV переваривают до готовности BglII. PEP049f переваривают до готовности BamHI и BglII, и приблизительно 700п.о. фрагмент, содержащий целую ЭПО-кодирующую область, получают геле-изоляция. RgIII-переваренную рММТнео BPV и фрагмент BamHI/BglII ЭПО из 700п.о. сшивают, и полученные плазмиды,

содержащие кДНК ЭПО, идентифицируют гибридизацией в колониях при помощи олигонуклеотидного d/GGTCACTGTCCCTGTCC/ зонда, являющегося специфичным к гену ЭПО. Из плазмид, которые являются положительными под гибридизационным анализом, одна /pEP015a/, которая имеет кДНК ЭПО в ориентация, так, что 5'-конец кДНК ЭПО является близлежащим к металлотнонеиновому промотору, идентифицируется путем переваривания EcoRI и KpnI.

pBPV-ЭПО

Плазмиду pEP015A переваривают до готовности BamHI для линейаризации плазмиды. Плазмиду pBPV-ММТneo /342 - 12/ также переваривают до готовности BamHI для получения двух фрагментов длиной 6,5 и 8кб. фрагмент, который содержит целый геном вируса бычьей папилломы, выделяют в геле. pEP015a/ BamHI. и Фрагмент BamHI длиной 8кб сшивают друг с другом, и плазмиду /pBPV-ЭПО/, которая содержит Фрагмент BPV, идентифицируют гибридизацией в колониях с использованием олигонуклеотидного зонда d/P-CCACACCCGGTACACA-OH/, который является специфичным к геному BPV. Переваривание ДНК pBPV-ЭПО с Hind III указывает на то, что направление транскрипции генома BPV является таким же, как и направление транскрипции металлотнонеинового промотора (как в pBPV-ММТneo /342 - 12/, см. фиг. 9). Плазида pBPV-ММТneo /342 - 12/ доступна из America Type Culture, Collection, Rockville, Maryland под входящим номером ATCC 37224.

Экспрессии

Следующие методы используются для экспрессии ЭПО.

Метод 1

Получают ДНК pBPV-ЭПО и приблизительно 25кг используют для трансфекции 1×10^6 клеток C127 /Lowy и др., J.of.Viol., 26:291 - 298 (1978) CHO, используя стандартные методики осаждения фосфата кальция (Graham и др., Virology 52:456 - 457 (1973)). Через пять часов после трансфекции трансфекционные среды удаляют, клетки шокируют глизерином, промывают и прибавляют свежую α -среду, содержащую 10%-ную фетальную бычью сыворотку. Через сорок восемь часов. клетки трипоинизируют и расщепляют в отношении 1:10 в DME среде, содержащей 500мкг/мл G 413 (Southern и др., Mol. Appl. Genet., 1:327 - 341 (1982)), и клетки выращивают в течение двух-трех недель. G418-устойчивые колонии затем выделяют индивидуально в микротитровый колодец и выращивают до субкультивирования в присутствии G418. Клетки затем промывают, прибавляют свежие среды, содержащее 10%-ную фетальную бычью сыворотку, и среды собирают через 24 часа. Кондиционированное среды испытывают, и они являются положительными для ЭПО под радио-имунным анализом и биологической пробой in vitro.

Метод II

Клетки C127 и 3Т3 котрансфецируют 25мкг pBPV-ЭПО и 2мкг pSV2neo (Southern и др., выше), как описано в Методе I. Это составляет приблизительно 10-кратный мольный избыток pBPV-ЭПО. Вслед за трансофекцией применяют методику, аналогичную описанной в Методе I.

Метод III

Клетки C127 трансфецируют 30мкг pBPV-ЭПО, как описано в Методе I. Вслед за трансфекцией и расщеплением (1:10) свежие среды меняют каждые три дня. Приблизительно через 2 недели появляются очаги BPV-трансформированных клеток. Отдельные очаги собирают в 1см колодцы микротитровой чашки, выращивают до субкультивирования и анализируют на активность ЭПО или его активность в кондиционированных средах.

Пример 14:

Экспрессия в клетках насекомых Конструирование pYEU EPOF L 13

Плазмидный вектор pYEU депонирован и доступен из America Type Culture, Collection, Rockville, Maryland под входящим номером ATCC 39991. Вектор модифицирует следующим образом:

pYEU N I

pYEU переваривают EcoRI для линейаризации плазмиды, затупляют с использованием большого Фрагмента ДНК-полимеразы I, и одиночный линкер No I.

GGCGGCCGCC

CCGCCGGCGG

вставляют сшиванием с тупым концом. Полученную плазмиду обозначают pYEU N I.

pYEYSI

pYEU переваривают SmaI для линейаризации плазмиды, и одиночный линкер SfiI

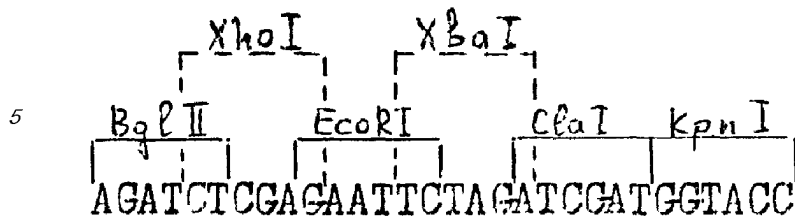
GGCCCCAGGGCCC

CCCGGGTCCCCGGG

вставляют сшиванием с тупым, концов. Полученную плазмиду обозначают pYEYSI.

pYEYSI BgKp

Плазмиду pYEYSI переваривают KpnI для линейаризации плазмиды, и приблизительно от 0 до 100п.о. отщепляют от каждого конца путем переваривания двунитевой эндонуклеазой Bal 31. Любые полученные концы, которые не совсем тупые, затупляют с использованием большого фрагмента ДНК-полимеразы I, и полилинкер



10 TCTAGAGCTCTTAAGATCTAGCTACCCATGG

вставляют сшиванием с тупым концом. Полилинкер вставляют в обеих ориентациях. Плазмиду, в которой ориентировал полилинкер таким образом, что сайт BglIII внутри полилинкера является близлежащим к полиэдральному генному промотору, называют pYEYSIBgKp. Плазмиду, в которой сайт KpnI внутри полилинкера является близлежащим к полиэдральному генному промотору, называют pYEYSIKpBg. Число пар оснований, которые были потеряны между первоначальным KpnI-сайтом в pYEYSI и полиэдральным промотором, не определено. pYEYSIBgKp депонирована и доступна из American Type Culture, Collection, Rockville, Maryland, под входящим номером ATCC 39988.

pYEYSIBgKp N I

pIYEU N I переваривают до готовности KpnI и PstI для продуцирования двух фрагментов. Большой фрагмент, который содержит плазмидное начало репликации и 3'-конец полиэдрального гена, получают выделением в геле (фрагмент А). pYEYSIBgKp переваривают до готовности PstI и KpnI для получения двух фрагментов, и меньший фрагмент, который содержит полиэдральный генный промотор и полилинкер, получают выделением в геле (фрагмент В). Фрагменты А и В затем объединяют ДНК-лигазой для образования новой плазмиды pYEYSIBgKp N I, которая содержит частично потерянный полиэдральный ген, в которой вставлен полилинкер, а также содержит NotI-сайт (замещая разрушенный EcoRI-сайт) и SfiI-сайт, который прикрывает фланг полиэдрального генного участка.

pIYEPO

pIYEYSI BGKpN I переваривают до готовности EcoRI для линейаризации плазмиды, и вставляют фрагмент EcoRI длиной 1340 пар оснований из α -HEPOF L 13. Плазмиды, содержащие ген ЭПО в ориентации так, что 5'-конец гена ЭПО является близлежащим к полиэдральному промотору и 3'-конец полиэдрального гена, идентифицируют путем переваривания BglIII. Одну из этих плазмид в ориентации, описанной выше, обозначают как pIYEPO.

Экспрессия ЭПО в клетках насекомых

Большие количества плазмиды pIYEPO получают трансформацией штампа JM101-tgIE.coli. Плазмидную ДНК выделяют посредством методики осветленного лизата (Maniatis и Fritsch, Gold Spring Harbor Manual) и подвергают дальнейшей очистке CsCl-центрифугированием. ДНК птама L – I вируса полиэдроза Antographa californica дикого типа (AcNPY) получают фенольной экстракцией вирусных частиц, и последующей очисткой вирусной ДНК.

Эти две ДНК затем контрастируют в клетки IPI B-SF-21 Spodoptera frugiperda (Vaughn и др., in vitro, Том В, стр. 213 - 217 (1977), используя методику трансфекции с фосфатом кальция (Potter и Miller, 1977). Для каждой чашки контрастируемых клеток используют хомутик ДНК AcNPY дикого типа и 10мкг pIYEPO. Чашки инкубируют при температуре 27°C в течение 5 дней. Затем собирают надосадочную жидкость, и экспрессию ЭПО в надосадочном слое подтверждают радиоиммунным анализом и биологической пробой in vitro

Пример 15:

Считка ЭПО

Кондиционированные среды клеток COS (121) концентрациями ЭПО до 200мкг/литр концентрируют до 600мл с использованием ультрафильтрационных мембран с молекулярным весом 10000, таких как Millipore Pellican, снабженный 5кв. фут (0,465кв.м) мембраной. Опыты осуществляют RIA как описано в Примере 6. Удерживатель из ультрафильтрации диафильтруют против 4мл 10ММ буферного раствора фосфата натрия при pH 7. Концентрированные и диафильтрованные кондиционированные среды содержат 2,5мг ЭПО в 380мг общего белка. Раствор ЭПО дополнительно концентрируют до 186мл, и осажденные белки извлекают центрифугированием при 110000xg в течение 30 минут.

Надосадочный слой, который содержат ЭПО (2,0мг) приводят к pH 5,5 50%-ной уксусной кислотой, позволяет перемешаться при температуре 4°C в течение 30минут, осадок извлекают центрифугированием при 13000 x g в течении 30 минут.

Хроматография на карбонилметильной сефарозе

Отстоявшийся слой от центрифугирования (20мл), содержащий 200мкг ЭПО (24мг общего белка), подводят к колонке, упакованной CM-Сефарозой (20мл), уравновешенной в 10ММ ацетате натрия, pH 5,5, прорывают 40мл того же буферного раствора. ЭПО, связанный с CM-Сефарозой, элюируют 100мл градиента NaCl (0 – 1) в 10ММ растворе фосфата натрия, pH 5,5. Фракции, содержащие ЭПО (общее количество 50мкг в 2мг общих белков, объединяют по группам и концентрируют до 2мл с использованием ультрафильтрационной мембраны Amicon UM10.

ВЭЖХ с обращенной фазой

Концентрированные Фракции из CM-Сефарозы, содержащие ЭПО, подвергают дальнейшей очистке ВЭЖХ с обращенной фазой, используя колонку Vydac C - 4. ЭПО подают на колонку, уравновешенную в 10%-гом

5 растворителе В (Растворитель А представляют собой 0,1% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ в воде; растворитель В представляет собой 0,1% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ в CH_3CN), с низкой степенью подачи 1мл/мин. Колонку промывают 10% В в течение 10минут и ЭПО элюируют линейным градиентом В (10 – 70% в течение 60 минут). Фракции, соержащие ЭПО, объединяют по группам (;40мг ЭПО в 120мкг общих белков) и лиофизируют. Дифилизованный ЭПО повторно структурируют в 0,1М растворе Iris-HCl при pH 7,5, содержащем 0,15М NaCl , и повторно хроматографируют ВЭЖХ с обращенной фазой. Фракции, содержащие ЭПО, объединяют по группам и анализируют электрофорезом в SDS-полиакриламидом (10%) геле ($\text{Lamelli U K., Nature}$). Объединенные фракции ЭПО содержат 15,5мкг ЭПО в 25мкг общего протеина.

10 Изобретение описано подробно, включая предпочтительные варианты его существования. Специалист, однако, поймет, сто при рассмотрении описания изобретения и чертежей могут возникнуть варианты и усовершенствования в пределах объема и сущности настоящего изобретения, заключенных в прилагаемой формуле изобретения.

15

Формула винаходу

20 1. Фрагмент геномной ДНК, кодирующий эритропоэтин человека и имеющий нуклеотидную последовательность от кодона GCC кодирующего Ala1 до кодона AGA, кодирующего концевой Arg166 в приведенной ниже полинуклеотидной последовательности формулы 1:

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A
4 4 8 8 2
C 2

U A
4 4 8 8 2
C 2

agcttctgggcttccagagccagctactttgcggaactcagcaaccagggcatctctgagtctccgcccagacc
 gggatgccccccagggaggtgtccgggagcccagcctttccagatagcagctccgcccaggtcccaagggtgcgcaa 150
 5 cgggctgcaactcccccccgcgaccagggcccgggagcagcccccatgaccacacgcacgtctgcagcagccc
 cgtcagccccgggagcctcaaccagggctcctgccccctgctctgacccccgggtggcccctacccctggcgacccc 300
 tcacgcacacagcctctccccacccccaccccgcgacgcacacatgcagataacagccccgacccccggccaga
 gccccagagtgccctggggcaacCCCCGGCGCTCGCTGGGCTGGCGCCGACCGCGCTGTCTCCCGGAGCCGGACCG 450
 10 GGGCCACCGCCCGCTCTGCTCCGACACGGCGCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGGCCCTGGGGCTGG
 CCCTGCCACCGCCGAGCTTCCCGGATGAGGGCCCCCGGTGTGGTCACCCGGCGGCCCCAGGTCCGCTGAGGGACC 600
 CCGGCCACCGCCGAGATGGGGTGCACGgtgagtactcgcgggctgggctcccggcccgggtccctgtt
 MetGlyValHisG
 15 tgagcggggatttagcgccccggctattggccagggaggtggctgggttcaaggaccggcgacttgtcaaggacc 750
 csgaagggggagsggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaac
 ctgacctgtgaaaggggacacagtttgggggttagggggaagaagggttgggggggttctgctgtgccagtggagag 900
 20 gaagctgataagctgataacctggggcgtggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccagg
 attgaagtttggccggagaagtgatgctggtagcctgggggtgggggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaa 1050
 ggccagggaggcagcacctgagtgccttgcattgggttggggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatg
 aaggaagctgtccttccacagccacccttctccctccccgcctgactctcagcctggctatctgttctagAATGT 1200
 25 CCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGGCTCCCTCTGGCCCTCCAGTCTCTGGCGGCCACCACCGC
 ProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSerLeuProLeuGlyLeuProValLeuGlyAlaProProArg
 CTCATCTGTGACAGCCGACTCCTGCAGAGGTACCTCTTCGAGGCCAAGGAGCCGAGAATATCACGgtgagacc 1350
 LeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLysGluAlaGluAsnIleThr
 30 ctccccagcncattccacagaactcacgctcagggcttcagggaactcctcccagatccaggaacctggcactt
 ggtttggggggaggtgggaagctagacactgccccctacataagaataagctctgggtggcccccaaccatacct 1500
 ggaaactaggaaggagcaaagccagcagatcctacgcctgtggccaggggccagagccttcagggacccttgact
 35 cccccgggctgtgtgcatttcagACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACAC 1650
 ThrGlyCysAlaGluHisCysSerLeuAsnGluAsnIleThrValProAspTh
 CAAAGTTAATTTCTATCCCTGGAAGAGGATGGAGgtgagtcccttttttttttttttttttttttttttttttttggagaat
 rLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgMetGlu
 40 ctcatattgcgagcctgatattggatgaaagggagaatgatcgaggggaaaggtaaaatggagcagcagagatgagg 1800
 ctgcttggggcgcagaggetcacgtctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccctgg
 agtttcagaccaccttaggcagcatagtgagatccccatctctacaacatttaaaaaaattagtcaggtgaag 1950
 tggtgcatgggtgtagtcccagatatttggaaaggctgaggcgggaggatcgcttgagcccaggaatttgaggctg
 45 cagtgagctgtgatcacaccactgcactccagcctcagtgacagagtgaggccctgtctcaaaaagaaaagaaa 2100
 aaagaaaaataatgagggetgtatggaatcagttcattattcattcactcactcactcactcattcattcattca
 50 ttcattcaacaagtcttattgcatacctctctgtttgctcagcttgggtgcttggggctgctgaggggagaggaggga 2250

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

gagsgtgacatcccctcagctgactcccagagtccactcccctgtagGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGCCAG
 ValGlyGlnGlnAlaValGluValTrpGln
 GGCCTGGCCCTGCTGTCCGAAGCTGTCTCTGGGGCCAGGCCCTGTTCCTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCC 2400
 GlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeuLeuValAsnSerSerGlnProTrpGluPro
 5 CTGCAGCTGCATGTGGATAAACCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCAG
 LeuGlnLeuHisValAspLysAlaValSerGlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGln
 gtgagtaggagcggacacttctgtcttgcccttctgtgaagaaggggagaagggtcttgctaaggagtacaggaac 2550
 tgtccgtatctcttccccttctgtggcactgcagcgacctcctgttttctccttggcagAACCAAGCCATCTCCC
 LysGlyAlaIleSerP
 10 CTCCAGATGGCGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGGCAAACCTCTCCGACTCTACT
 roProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLysLeuPheArgValTyrS
 CCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGCCCTGCAGGACAGGGGACAGATCACCAGGTGTG
 erAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArg
 15 CCACCTGGGCATATCCACCACCTCCCTCACC AACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCGGCCACTCCTGAACCCCC 2850
 TCCAGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCAGTCCAGCAATGACATCTCAGGGCCAGA
 GGAACCTGTCCAGAGAGCAACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCAACTTGAGGGCCCAGACCAGGAAGCATT 3000
 20 CAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGGCCATGCTGGGAAGACGCCCTGACCTCACTCGCCACCCTGCAAAATT
 TGATGCCAGGACACCCTTTGCAGGGCATTACCTGTTTTGCACCTACCATCAGGGACAGGATGACCTGGAGAAC 3150
 TTAGCTGCCAAGCTGTGACTTCTCCAGCTCTCACGGGCATGGGCACCTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTGACAC
 CGGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGCTGGCCTCTGCCTCTCATGGGGTCCAACTTTTGTCTATTCT 3300
 25 TCAACCTCATTGACAAGAAGCTGAAACCACCaatatgactcttzgcttttctgtttcttgggaacctccaaatccc
 ctggctctgtcccactcctggcagca 3400

2. Фрагмент ДНК по п. 1, отличающийся тем, что имеет нуклеотидную последовательность от кодона ATG кодирующего начальный метионин Met-27 до кодона AGA кодирующего концевой Arg166 в полинуклеотидной последовательности формулы 1.

3. Фрагмент кДНК, кодирующий эритропоэтин человека и имеющий последовательность от кодона ATG кодирующего начальный Met27 до кодона AGA кодирующего концевой Arg166 в приведенной ниже полинуклеотидной последовательности формулы 2:

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

```

                                     cccgggagcc  ggaccggggc  caccgcgccc  gctctgctccg  acaccgcgcc
5  cccctggacag  ccgcccctctc  ccccagggccc  gtggggctg  cccctgcaccg  ccgagcttcc  cgggatgaggg  cccccgctgc
                                     -27
                                     MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
                                     ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT
10  ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
    GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG CTG TCG CTC CGT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC
15  1   SH 10 20
    Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
    GCC CCA CCA GCG CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTC GAG GCC AAG
                                     *
    Glu Ala Glu Asp Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
    GAG GCC GAG AAT ATC ACC ACC GGC TCT CCT GAA CAC TCC ACC TTC AAT CAG AAT ATC ACT
20  Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
    GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG CAG CAG CAG GCC
                                     50
    Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
    GTA GAA GTC TGG CAG GCG CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTC CCG GCG CAG GCC CTG
25  Leu Val Asp Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
    TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC ACT
30  Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
    GGC CTT CCG AGC CTC ACC ACT CTG CTT CCG GCT CTG GCA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TCC
                                     110
    Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
    CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA
35  Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
    CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GCG GAG GCC
40  SH 166
    Cys Arg Thr Gly Asp Arg
    TGC ACG ACA GCG CAC ACA TGA ccaggtg  tgtccacctg  ggcatatcca  ccacctcccc  caccacatt
    gcttgtgcca  caccctcccc  cgccactcct  ganccccgctc  gaggggctct  cagctcagcg  ccagcctgtc
45  ccatggacac  tccagtgcca  gcaatgacat  ctcaggggccc  agaggaactg  tccagagggc  sactctgaga
    tctaaggatg  tcacagggcc  actttgaggg  cccagagcag  gaagcattca  gagngcagct  ttaactcag
    ggacagagcc  atgctgggaa  gacgcctgag  ctcactcggc  accctgcaaa  atttgatgcc  aggacagcct
    ttggggcgca  tttacctggt  ttccaccta  ccacagggga  caggatgacc  tggagaactt  aggtggcaag
50  ctgtgacttc  tccaggtctc  accggcatgg  gcactccctt  ggtggcaaga  gcccccttga  caccgggggtg
    gtgggaacca  tgaagacagg  atgggggctg  gcctctggct  ctcatggggg  ccaagtcttg  tgtattcttc
    aacctcattg  acaggaactg  aaaccaccas  aaaaaaaaaa

```

- 55 4. Фрагмент кДНК по п. 3, отличающийся тем, что дополнительно включает нуклеотиды, которые входят в состав 50 нуклеотидов, предшествующих кодону ATG, кодирующему Met27, до кодона TGA, следующего за кодомом AGA кодирующим, Arg166 в полинуклеотидной последовательности формулы 2.
- 60 5. Способ получения эритропоэтина человека, предусматривающий культивирование в подходящей среде эукариотических хозяйских клеток, отличающийся тем, что хозяйские клетки содержат последовательность ДНК по любому из пп. 1-2, оперативно присоединенную к последовательности, контролирующей экспрессию, отделение полученного таким образом эритропоэтина от клеток и культуральной среды.
- 65 6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что культуральная среда содержит фетальную сыворотку.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что упомянутый эритропоэтин представляет собой рекомбинантный эритропоэтин.
8. Способ по любому из пп. 5-7, отличающийся тем, что хозяйскими клетками являются клетки

млекопитающих.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки COS CHO, CI27 или 3T3.

5 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки 3T3.

11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка CHO.

10 12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что клетки CHO способны продуцировать рекомбинантный эритропоэтин, который является гликозилированным по N- и O-положениям с включением фукозы и N-ацетилгалактозамина после чего полученный рекомбинантный эритропоэтин отделяют от клеток и среды.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что рекомбинантный эритропоэтин человека имеет структуру гликозилирования, включающую соответствующие молярные уровни гексозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 1,4:1, а именно галактозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 0,9:1 и маннозы и N-ацетилгалактозамина в соотношении 0,5:1.

15 14. Способ по п. 7, отличающийся тем, что упомянутая последовательность ДНК включена в вектор, дополнительно содержащий ДНК вируса папилломы быка.

20 15. Способ получения эритропоэтина человека, предусматривающий культивирование в подходящей среде эукариотических хозяйских клеток, отличающийся тем, что хозяйские клетки содержат последовательность ДНК по любому из пп. 3-4, оперативно присоединенную к последовательности, контролирующей экспрессию, отделение полученного таким образом эритропоэтина от клеток и культуральной среды.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что культуральная среда содержит фетальную сыворотку.

25 17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что упомянутый эритропоэтин представляет собой рекомбинантный эритропоэтин.

18. Способ по любому из пп. 15-17, отличающийся тем, что хозяйскими клетками являются клетки млекопитающих.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки COS, CHO, CI27 или 3T3.

30 20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки 3T3.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что хозяйские клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO).

35 22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что клетки CHO способны продуцировать рекомбинантный эритропоэтин, который является гликозилированным по N- и O-положениям с включением фукозы и N-ацетилгалактозамина, после чего полученный рекомбинантный эритропоэтин отделяют от клеток и среды.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что рекомбинантный эритропоэтин человека имеет структуру гликозилирования, включающую соответствующие молярные уровни гексозы и N-ацетилглюкозамина в

40 соотношении 1,4:1, а именно галактозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 0,9:1 и маннозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 0,5:1.

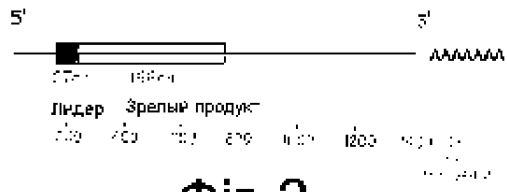
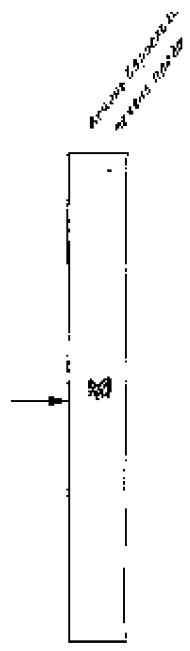
24. Способ по п. 14, отличающийся тем, что упомянутая последовательность ДНК включена в вектор, дополнительно содержащий ДНК вируса папилломы быка.

45 25. Способ получения фармацевтической композиции эритропоэтина человека, предусматривающий культивирование в подходящей среде эукариотических хозяйских клеток, трансформированных последовательностью ДНК, кодирующей эритропоэтин человека по любому из пп. 1-2, причем упомянутая последовательность оперативно присоединена к последовательности, контролирующей экспрессию, отделение полученного таким образом эритропоэтина человека от клеток и культуральной среды, приготовление упомянутого эритропоэтина в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

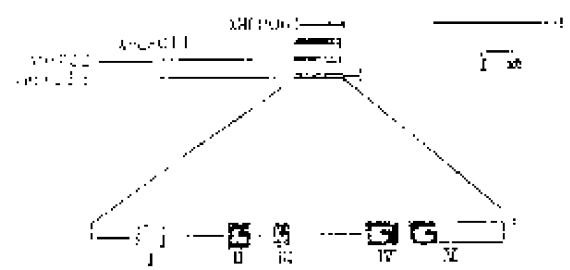
50 26. Способ получения фармацевтической композиции эритропоэтина человека, предусматривающий культивирование в подходящей среде эукариотических хозяйских клеток, трансформированных последовательностью ДНК, кодирующей эритропоэтин человека по любому из пп. 3-4, причем упомянутая последовательность оперативно присоединена к последовательности, контролирующей экспрессию, отделение полученного таким образом эритропоэтина человека от клеток и культуральной среды, приготовление упомянутого эритропоэтина в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

60

65



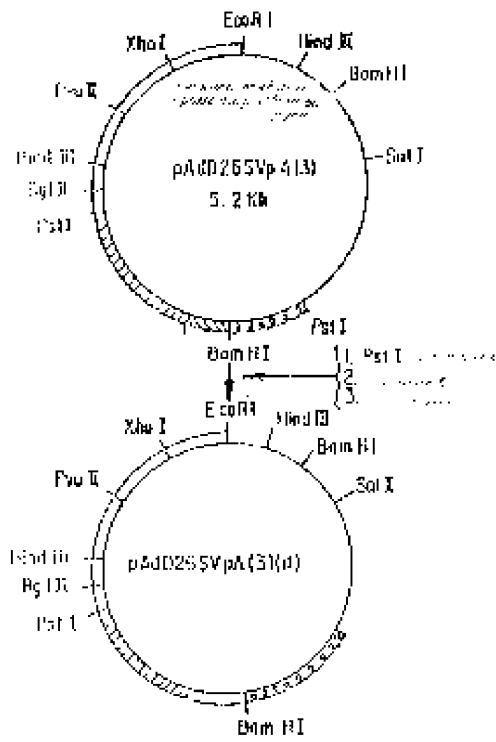
Фиг. 2



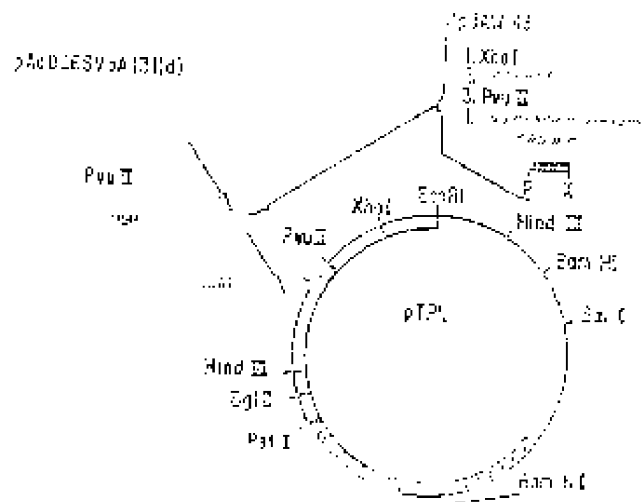
Фиг. 3



Фиг. 4



Φig. 5a



Φig. 5a

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

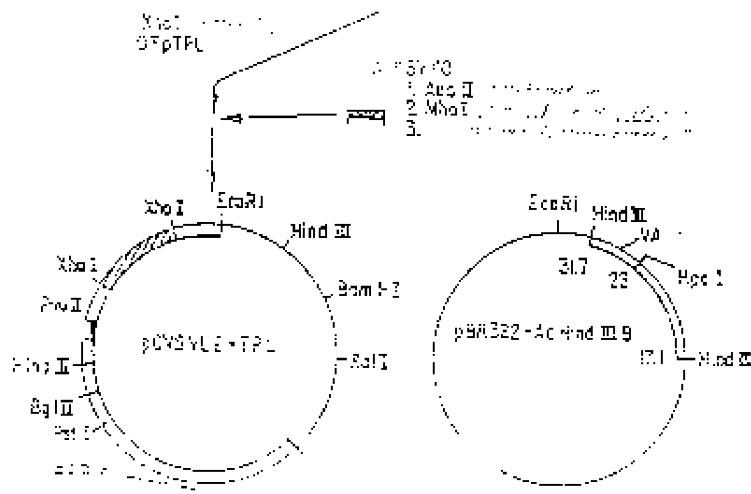


Fig. 5b

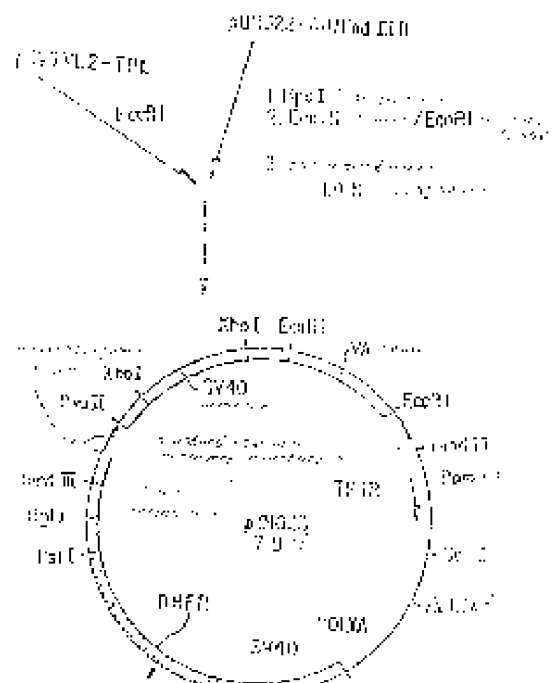


Fig. 5b

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2

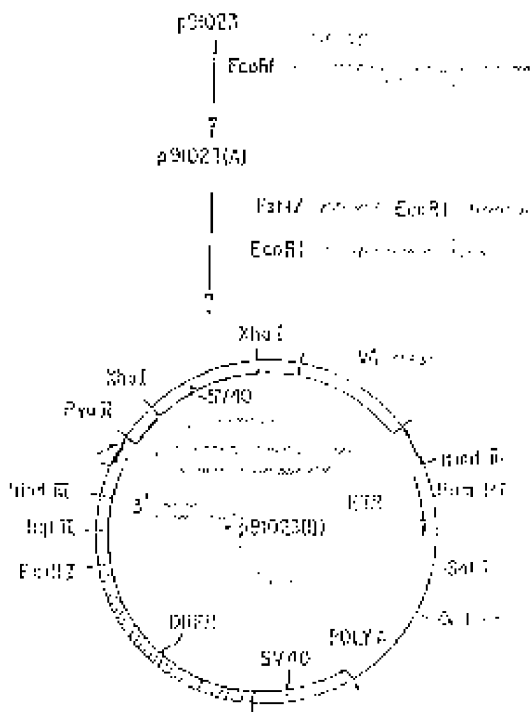


Fig. 5c

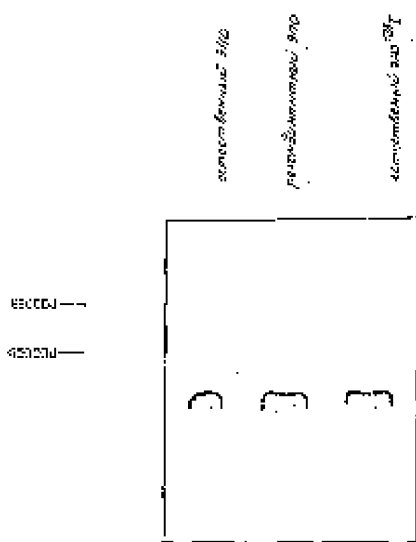
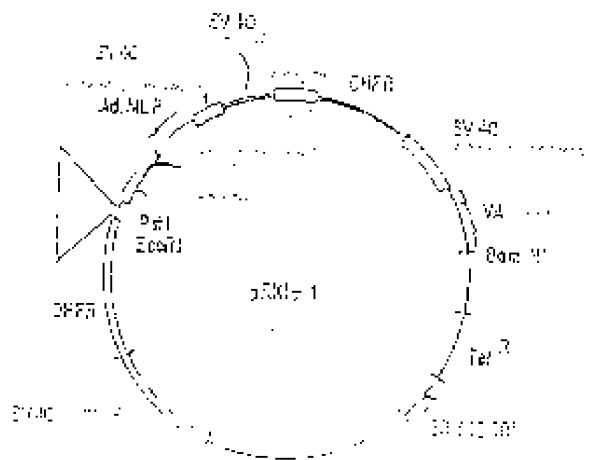


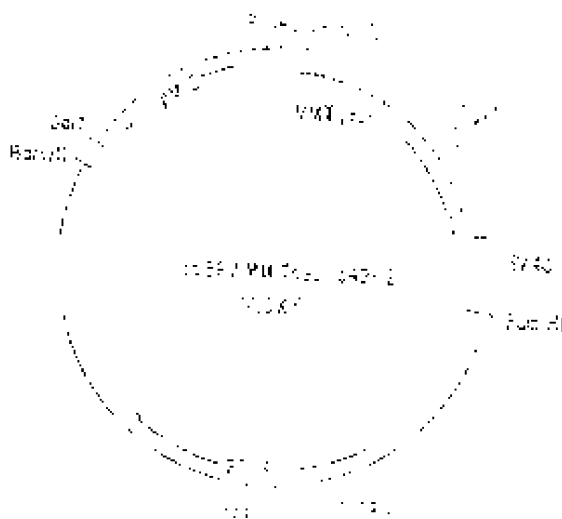
Fig. 6

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2



Фіг. 7



Фіг. 8

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 3, 15.03.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 4 4 8 8 2 C 2

U A 4 4 8 8 2 C 2