

Даний винахід відноситься до експресуючих векторів, що містять IE2-промотор mCMV-гена, або його фрагмент, що стимулює функціональну експресію, а також і/або IE2-енхансер гена mCMV, або його фрагмент, що посилює функціональну експресію, де вказаний експресуючий вектор не містить якого-небудь цілого гена mCMV, до хазяйських клітин, що містять такі вектори, до способів отримання необхідних поліпептидів з використанням даних експресуючих векторів, а також до використання вказаних експресуючих векторів.

Відповідно до даного винаходу, експресуючі вектори, що містять промотор mCMV IE2 і промотор mCMV IE1, необов'язково разом з новим енхансером mCMV IE2, є переважними, особливо якщо обидва промотори складають елементи однієї структури та є різноспрямованими.

В останні десятиріччя експресуючі вектори використовують як носії для експресії генів або кДНК, що кодують поліпептиди або білки в хазяйських клітинах, які цікавлять. Сильні вірусні або клітинні промотори та енхансери використовують для високорівневої експресії гена, що представляє інтерес, за допомогою тимчасової або постійної (стійкої) трансфекції рекомбінантної ДНК у відповідні хазяйські клітини. Показано, що в цьому відношенні особливо придатна передранішня (IE) ділянка цитомегаловірусу людини (hCMV), а експресуючі вектори, що містять генні елементи, отримані з даної ділянки, відомі, наприклад, з EP0323997B1.

До останнього часу генні регуляторні послідовності з мишачого цитомегаловірусу (mCMV) використовують рідко, незважаючи на те, що, як було показано, отримані з mCMV регуляторні елементи є дуже потужними, навіть сильнішими за аналогічні копії вірусу людини [Kim et al., 2002].

У патенті США №4963481 (de Villiers) описані експресуючі вектори, що містять ДНК, яка кодує гетерологічний білок під транскрипційним контролем ДНК-фрагментів, отриманих з IR-генної ділянки mCMV, що містить фрагмент розміром приблизно 2270 пар основ (п.о.), виділений рестрикційною ендонуклеазою PstI з даного вірусного геному. Неповний варіант даного фрагмента 1387 п.о. істотно поліпшує ефективність вказаного ДНК-фрагмента як промотору для експресії вищезазначеного гетерологічного білка.

У патенті США №4968615 (Kozinowski) описані молекули рекомбінантної ДНК, що містить транскрипційні енхансери з мишачого цитомегаловірусу (MCMV), які можна використовувати для посилення транскрипції структурних генів еукаріотичних клітин. Показано, що даний mCMV-енхансер розташований в межах 2,27 т.п.о. PstI-фрагмента, ідентифікованого de Villiers (патент США №4963481).

Manning and Mocarski (1988) проаналізували функціональну значущість IE2-ділянки mCMV для реплікації мишачого цитомегаловірусу. Для цього сконструювали рекомбінантний вірус, який містив репортерний ген lacZ під транскрипційним контролем IE-енхансера/промотору mCMV, що розриває, тим самим, цей IE2-ген. Дійсно, експресія IE2-гена не спостерігалася, а вірус реплікувався нормально. Тому ці автори зробили висновок, що даний IE2-ген, який не зберігається у таких цитомегаловірусах як mCMV і hCMV, не є істотним для реплікації вірусу. Manning and Mocarski не змогли визначити або підтвердити особливу користь у наявності енхансер/промоторної IE2-ділянки.

В останніх публікаціях показана додаткова відмінність між IE-ділянкою CMV миші та людини. Мишачий локус експресує другу основну мРНК у протилежному напрямку від мРНК першого IE2-гена. Цей другий передранішній ген назвали IE2, а його промоторну послідовність визначили як IE2-промотор [Messerle et al., 1991].

Вказана IE2-ділянка з mCMV досі не використовувалася у векторах для експресії гетерологічних білків.

Даний винахід оснований на даних, відповідно до яких вектор, що має ДНК-елемент, який містить IE2-промоторну ділянку з mCMV, може ефективно запускати експресію гена, що представляє інтерес, в трансфікованих хазяйських клітинах.

Крім того, даний винахід оснований на даних по ідентифікації нового енхансера на IE2-ділянці mCMV, який в даному описі називають IE2-енхансер mCMV. Даний енхансер задовольняє критерій, що пред'являється до визначення енхансера, тобто посилює експресію, незалежно від (1) розміщення, (2) орієнтації, і від (3) посилення експресії з гетерологічного промотору.

Тому перший аспект даного винаходу відноситься до експресуючого вектора, що містить IE2-промотор mCMV-гена, або до його фрагмента, який посилює функціональну експресію, а також/або до IE2-енхансера mCMV-гена, або до його фрагмента, що посилює функціональну експресію, де вказаний експресуючий вектор не містить ніякого цілого гена mCMV.

Другий аспект даного винаходу відноситься до хазяйської клітини, що містить вектор відповідно до даного винаходу.

Третій аспект даного винаходу відноситься до способу отримання поліпептиду, який представляє інтерес, що включає в себе стадію трансфекції хазяйської клітини вектором відповідно до даного винаходу.

Четвертий аспект даного винаходу відноситься до способу отримання поліпептиду, який представляє інтерес, що включає в себе стадію культивування хазяйської клітини згідно з винаходом.

П'ятий аспект даного винаходу відноситься до використання вектора відповідно до даного винаходу для експресії одного або декількох генів або кДНК, що представляють інтерес.

Шостий аспект даного винаходу відноситься до використання вектора згідно з винаходом для селекції клонів, які експресують великі кількості гена, що представляє інтерес.

Сьомий аспект відноситься до використання вектора відповідно до даного винаходу для ДНК-терапії.

На Фіг.1 представлена послідовність двоспрямованого ДНК-елемента, отриманого з IE-ділянки mCMV, для використання в експресуючих конструкціях. Вказані, відповідно, +1-сайти і ТАТА-бокси промоторів IE2 і IE1. Корові промотори обох генів виділені в чотирикутнику. Сайти рестрикції HpaI і XhoI виділені жирним шрифтом. Положення -682 вказане відносно +1 IE1.

На Фіг.2 представлені репортерні конструкції A-G. Люциферазний репортерний ген представлений у вигляді жирної лінії, а промотори вказані у вигляді світлих стрілок.

A: Негативний безпромоторний контроль (pGL3 Головний).

B: SV40-промотор/енхансерний запуск люциферазного репортерного вектора (pGL3 Контроль).

C: Експресія люциферази, керована IE1-промотором (pmCMV-люцифераза, керована IE1).

D: Експресія люциферази, керована IE2-промотором (prevmCMV-люцифераза, керована IE2).

E: Експресія люциферази, керована промотором IE2, IE1-промотор видалений (prevmCMV-люцифераза).

(ΔXhoI), керована IE2, IE1 відсутній).

F: Експресія люциферази, керована IE1-промотором, при тому що IE2-промотор видалений (pBS.MCMV3-люцифераза, керована IE1 (1.4 т.п.о.), IE2 відсутній).

G: Скорочений варіант запуску експресії люциферази під IE1-промотором (p-680-люцифераза, керована IE1 (скорочений варіант, 0,68 т.п.о.)).

На Фіг.3 представлена двоспрямована конструкція, подібна конструкції C на Фіг.2 (конструкція C-2), з послідовністю, що кодує IL-18BP (жирна лінія), приєднаною до IE2-промотору. Таким чином, в даній конструкції IE1-промотор запускає експресію mCMV-люциферази, і одночасно IE2-промотор mCMV запускає експресію IL-18BP. Трикутник: інтрон. Чорні овали: polyA.

На Фіг.4 показана експресія люциферазного репортерного гена в різних репортерних конструкціях, які зображені на Фіг.2, конструкції A-G. Клітини CHO-S, вирощені на безсироватковому середовищі (SFM), були випадковим чином трансфіковані конструкціями A-G або псевдотрансфіковані. Активність люциферази виражена у відносних світлових одиницях (RLU).

На Фіг.5 представлена експресія люциферази, виміряна в RLU в стабільних групах CHO-S-клітин. Дані клітини вирощують в SFM після трансфекції конструкціями D, C, F і E, як зображено на Фіг.2. Експресію люциферази визначають після 21 дня селекції.

На Фіг.6 показані результати вимірювання в RLU після тимчасової трансфекції з допомогою 900, 500, 300 і 100нг двоспрямованої конструкції C-2, представленої на Фіг.3.

На Фіг.7 показані кількості IL-18BP в нг/л в супернатантах культури клітин, отримані в експерименті з тимчасовою трансфекцією, відповідно до Фіг.6 (конструкція C-2).

На Фіг.8 представлене співвідношення кількості IL-18BP і люциферази, виміряної відповідно до експериментів на Фіг.6 і 7.

На Фіг.9 представлені кількості люциферази в RLU (на лівій y-осі) та IL-18BP в нг/мл (на правій y-осі), експресовані в 48 індивідуальних клонах, які були відібрані через 8 днів після трансфекції двоспрямованою конструкцією C-2 (як показано на Фіг.3). Межа виявлення люциферази складала приблизно 500 RLU, і 2,5нг/мл - для IL-18BP. Кожний крок на осі X відповідає одному одиничному клону.

На Фіг.10(a) показані репортерні конструкції H-N. Люциферазний репортерний ген (Luc) виділений жирною лінією, а відповідні промотори IE1 і IE2 вказані світлим стрілками. Енхансери представлені у вигляді сірих овалів: світло-сірий овал використаний для відомого IE1-енхансера, а темно-сірий овал використаний для нового IE2-енхансера.

H: Двоспрямована конструкція з IE2-промотором керує експресією люциферази;

I: Експресією люциферази керує IE2-промотор, а IE1-промотор видалений;

J, K, L, M, N: конструкції, що містять укорочені mCMV-промотори, цифрами вказані положення, що відповідають числу пар основ для mCMVp відносно +1 IE2:

J: починаючи від -1076

K: починаючи від -783

L: починаючи від -587

M: починаючи від -387

N: починаючи від -189.

На Фіг.10(b) показана експресія в RLU для репортерних конструкцій H-N відповідно до Фіг.10(a), після тимчасової трансфекції клітин CHO-S, які вирощують в безсироватковому середовищі.

На Фіг.11(a) представлені додаткові конструкції O-Y, в яких об'єднані новий IE2-енхансер (сірий овал) з SV40-промотором. Вказаний сірий овал відповідає IE2-енхансеру від -587 до -189, половина сірого овалу відповідає IE2-енхансеру від -387 до -189. Стрілки вище даного IE2-енхансера вказують напрям енхансерної послідовності. Люциферазний репортерний ген представлений у вигляді жирної лінії, SV40-промотор вказаний світлою стрілкою. Чорний овал: polyA.

O: довгу IE2-енхансерну послідовність (-587/-189) клонують по 5'-кінцю SV40-промотора;

P: коротку IE2-енхансерну послідовність (-387/-189) клонують по 5'-кінцю SV-промотору;

Q: довгу IE2-енхансерну послідовність (-587/-189) клонують по 5'-кінцю SV40-промотора в зворотній орієнтації;

R: коротку IE2-енхансерну послідовність (-387/-189) клонують по 5'-кінцю SV40-промотора в зворотній орієнтації;

S: довгу IE2-енхансерну послідовність (-587/189) клонують по 3'-кінцю люциферазного гена;

T: коротку IE2-енхансерну послідовність (-387/-189) клонують по 3'-кінцю люциферазного гена;

U: довгу IE2-енхансерну послідовність (-587/-189) клонують по 3'-кінцю люциферазного гена в зворотній орієнтації;

V: коротку IE2-енхансерну послідовність (-387/-189), клонують по 3'-кінцю люциферазного гена в зворотній орієнтації;

W: Контроль, SV40-промотор і SV40-енхансер в 3'-кінці кодуєвої послідовності люциферази;

X: Контроль, експресія люциферази, керована SV-промотором без якого-небудь енхансера;

Y: негативний контроль, скрізь без промотору.

На Фіг.11(b) представлена експресія люциферази з репортерними конструкціями O-Y, як показано на Фіг.11(a). Клітини CHO-S, вирощені в безсироватковому середовищі (SFM), трансфікують випадковим чином за допомогою конструкцій O-Y. Люциферазну активність зображують у вигляді складеної стрічки, довжина якої визначена відносно контролю X (значення 1), тобто відносно експресії, керованої SV40-промотором без якого-небудь енхансера. Світлі чотирикутники: довгий IE2-енхансер (-587/-189), заштриховані прямокутники: короткий IE2-енхансер (-387/-189). X-вісь являє собою логарифмічну шкалу.

На Фіг.12 представлений експеримент порівняння нового IE2-енхансера з відомим hCMV-енхансером. Клітини трансфікують за допомогою контрольної конструкції A (pGL3 основна, див. Фіг.2, з відсутністю промотору), контрольної конструкції B (pGL3 контрольна, див. Фіг.2, SV40-промотор з SV40-енхансерною послідовністю в 3'-кодуєчій ділянці люциферази), контрольної конструкції X (SV-Luc⁺, див. Фіг.11a, SV40-промотор без енхансера), а також за допомогою конструкцій O-Q (див. Фіг.11a) або за допомогою конструкцій O-2 і Q-2, в яких IE2-енхансерну послідовність (довгий варіант, від -587 до -189) замінюють

відомою hCMV-енхансерною послідовністю (SEQ ID NO: 2). Люциферазу вимірюють в RLU (х-вісь). Заштриховані прямокутники: з відомим hCMV-енхансером.

Прямокутники сірого кольору: з новим IE2-енхансером.

На Фіг.13 показаний двоспрямований вектор, що використовується для одночасної експресії IL-18BP і люциферази. Промотори IE1 та IE2 вказані світлими стрілками. Трикутник являє собою інтрон А з IE-ділянки hCMV, а овал сірого кольору - сигнал поліаденілування. Чорний квадрат відповідає сигнальному пептиду.

Конструкція #26: Люцифераза експресується під IE1-промотором, а IL-18BP експресується під IE2-промотором. Послідовність між обома промоторами як в конструкції Н на Фіг.10(а),

Конструкція #140. Люцифераза експресується під IE2-промотором, а IL-18BP експресується з IE1-промотору. Між цими двома промоторами розташовується IE2-енхансер (від -587 до -189).

На Фіг.14 представлені дані про кількості експресованої люциферази (RLU, ліва Y-вісь) та IL-18BP (нг/мл, права Y-вісь) після тимчасової трансфекції CHO-клітин, що вирощуються в безсироватковому середовищі, за допомогою будь-якої конструкції, #26 або #140, відповідно до Фіг.13. Прямокутники: експресія люциферази; чорні ромби: експресія IL-18BP.

На Фіг.15 представлені дані по експресії люциферази (RLU, ліва Y-вісь) і IL-18BP (нг/мл, права Y-вісь) в стійких групах, трансфікованих за допомогою будь-якої конструкції, #26 або #140, відповідно до Фіг.13. Експресію вимірюють через 7 днів після трансфекції. Клітини відбирають у присутності пуроміцину (+puro) або ж відбирають протягом 3-х тижнів без пуроміцину (-puro). Прямокутники: експресія люциферази, чорні ромби: експресія IL-18BP.

На Фіг.16 показана тривалість експресії люциферази як в експерименті на Фіг.15. На осі x відкладений час у тижнях. Дані, представлені на Фіг.15, відповідають 3 тижневим даним на Фіг.16. Чорний ромб: #26+puro, маленький квадрат: #140+puro, чорний трикутник: #26-puro, великий квадрат: #140-puro.

На Фіг.17 показана тривалість експресії IL-18BP відповідно до експериментів Фіг.16. Позначення - як на Фіг.16.

На Фіг.18 представлені результати аналізу прото-клонів відносно експресії люциферази (квадрати) в RLU (ліва y-вісь) і експресії IL-18BP (ромби) в нг/мл (права y-вісь). Кожний крок на осі x відповідає індивідуальному прото-клону. Прото-клони створюються CHO-клітинами, стійко трансфікованими конструкцією #26, і відбираються в присутності пуроміцину.

На Фіг.19: Те саме, що і на Фіг.18, але прото-клони створюються клітинами, трансфікованими конструкцією #140.

Фіг.20: Прото-клони, трансфіковані будь-якою конструкцією, #26 або #140, аналізують на предмет експресії люциферази в 96-ямковому планшеті, інвертованому за допомогою пристрою ChemiDoc.

Відповідно до даного винаходу, несподівано виявилось, що промотор передранішнього другого (IE2) гена мишачого цитомегаловірусу (mCMV) виявився ефективним для стимуляції експресії поліпептиду, що представляє інтерес, який, власне, не є IE2-білком mCMV, тобто гетерологічним поліпептидом або білком. Даний експресуючий вектор за припущенням не є власне мишачим цитомегаловірусом або ж таким, що містить будь-які повні гени вірусу mCMV, але являє собою вектор для експресії рекомбінантного білка.

Внаслідок цього даний винахід відноситься до експресуючого вектора, що містить IE2-промотор mCMV-гена, або до його фрагмента, який стимулює функціональну експресію, де даний експресуючий вектор не містить будь-якого повного гена mCMV.

Крім цього, в IE2-ділянці mCMV був ідентифікований новий енхансер, який називається тут IE2-енхансер mCMV, або IE2-енхансер. Даний енхансер посилює експресію незалежно від його локалізації або орієнтації відносно даного гена, а також посилює експресію з гетерологічних промоторів, відповідаючи, таким чином, основному критерію енхансера.

У зв'язку з цим даний винахід відноситься також до експресуючого вектора, що містить вказаний IE2-енхансер mCMV-гена, або до його фрагмента, що посилює функціональну експресію, де експресуючий вектор не містить будь-якого повного гена mCMV.

Фахівцям в даній галузі техніки очевидно, що вектор згідно з винаходом може містити лише один IE2-промотор mCMV або IE2-промотор у поєднанні з будь-яким придатним відомим енхансером. Фахівцям в даній галузі також очевидно, що вектор згідно з винаходом може містити лише один IE2-енхансер mCMV або IE2-енхансер у поєднанні з будь-яким придатним промотором. Крім того, вектор згідно з винаходом може містити IE2-промотор mCMV у поєднанні з IE2-енхансером mCMV.

Сам IE2-ген mCMV відомий, [наприклад, з публікації Messerie et al., 1991p.].

Термін "промотор", що використовується тут, відноситься до ділянки ДНК, функції якої полягають у контролі транскрипції однієї або декількох ДНК-послідовностей і який структурно ідентифікується за наявністю сайту зв'язування ДНК-залежної РНК-полімерази і за наявністю інших ДНК-послідовностей, що впливають на регуляцію промоторної функції. Функціонально експресуючий посилюючий фрагмент промотору представляє неповну або усічену промоторну послідовність, що зберігає активність як промотор. Промоторну активність можна виміряти будь-яким методом, відомим в даній галузі, наприклад, репортерним методом з використанням люциферази як репортерного гена [Wood, 1991; Seliger and McElroy, 1960; de Wet et al., (1985) або комерційно придатної люциферази від Promega®).

Відповідно до даного винаходу, IE2-промотор може, наприклад, включати в себе послідовність від положення +1 до ТАТА-боксу, як зазначено на Фіг.1. IE2-промотор може також включати в себе послідовність, що називається тут "коровий промотор", що тягнеться від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 39 в послідовності, зображений на Фіг.1 (чотирикутник). Фахівцям в даній галузі відомо, що послідовність IE2-промотору mCMV може бути довшою або коротшою даного корового промотору доти, поки він запускає транскрипцію ДНК-послідовності, оперативно з ним зв'язаної. Наприклад, IE2-промотор може також включати в себе 100-200 пар основ ліворуч від даного корового промотору. Така промоторна ділянка називається також "проксимальним промотором". Фахівцям в даній галузі повинно бути також очевидно, що терміни "промотор" та "енхансер" (див. нижче) точно не визначаються, і тому даний промотор може включати в себе енхансерні ділянки або енхансерні ділянки можуть включати в себе промоторні ділянки, залежно від термінології та контексту.

Термін "вектор" відноситься до будь-якого носія екзогенної ДНК або РНК, який придатний для

переміщення екзогенної ДНК в хазяйську клітину для реплікації і/або для відповідної експресії екзогенної ДНК за допомогою даної хазяйської клітини.

Під терміном "оперативно зв'язаний", що використовується тут, мається на увазі функціональне злиття промотору зі структурним геном чи кДНК, або з іншою послідовністю ДНК, яка знаходиться під контролем даного промотору. Тому, термін "оперативно зв'язаний", що використовується тут, не обмежується прямим злиттям ДНК-послідовностей.

Термін "повний ген mCMV" відноситься до вірусного гена мишачого цитомегаловірусу, який має свої власні (ендогенні, вірусні) 5'- і 3'-регуляторні елементи.

"Енхансерна ділянка" відноситься до ділянки ДНК, функція якої полягає в підвищенні рівня транскрипції одного або декількох генів. Зокрема, під терміном, "енхансер", що використовується тут, мається на увазі регуляторний ДНК-елемент, який посилює, збільшує, поліпшує або підвищує якість експресії гена незалежно від його місцезонашування та орієнтації відносно експресуючого гена, і який може бути таким, що посилює, збільшує, поліпшує, підвищує якість або перевищує експресію більш ніж одного промотору. Переважно, якщо даний енхансер посилює експресію одночасно більше ніж з одного промотору. Фрагмент енхансера, що посилює функціональну експресію, являє собою неповну або усічену енхансерну послідовність, що зберігає дану посилюючу здатність.

Вектор згідно з винаходом переважно складається з фрагмента, що включає в себе нуклеотиди від -387 до -189 з лівої IE2-ділянки mCMV, і нумерація нуклеотидів здійснюється відносно положення +1 IE2-гена. Даний фрагмент має енхансерну функцію та називається тут коротким варіантом енхансера IE2.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу даний вектор складається з фрагмента, що містить нуклеотиди від -587 до -189 лівої IE2-ділянки mCMV, і нумерація нуклеотидів здійснюється відносно +1 IE2-гена. Даний фрагмент має енхансерну функцію та називається тут довгим варіантом IE2-енхансера.

Вектор згідно з винаходом може також включати в себе ще й додатковий IE-енхансер mCMV, або його посилюючий функціональну експресію фрагмент, що називається тут "IE1-енхансер mCMV".

Такий IE1-енхансер mCMV відомий в даній галузі, наприклад, з патенту США №4968615. Він, наприклад, може тягнутися в послідовності, представлений на Фіг.1, від положення -587 до -147 або від положення -682 до -147, нумерація яких здійснюється відносно положення +1 IE1-гена. IE1-енхансер mCMV, який може бути використаний відповідно до даного винаходу, може додатково включати в себе послідовність, що тягнеться від пари основ -1330 до -488 відносно положення +1 в IE1 на Фіг.1. Дана енхансерна ділянка може також включати в себе весь промотор або його частину.

Завдяки використанню mCMV-енхансера в доповнення до IE2-промотору, можна ще більше підвищити експресію поліпептиду, що представляє інтерес.

Відповідно до даного винаходу, вказаний вектор додатково містить промотор, який відрізняється від IE2-промотору mCMV, або його фрагмент, що посилює функціональну експресію.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу вектор згідно з винаходом включає в себе перший і другий промотор вірусного, клітинного або штучного походження, або його фрагмент, що посилює функціональну експресію.

Тому в переважному варіанті здійснення даного винаходу даний вектор включає в себе IE2-промотор mCMV у поєднанні з другим промотором, або його фрагментом, що посилює функціональну експресію. Приклади додаткових придатних промоторів включають в себе hCMV-промотор, металотіонеїновий промотор (MT), SV40-промотор або штучний промотор. Переважно, другий промотор являє собою додаткову копію IE2-промотору mCMV. Такі додаткові промотори можуть посилити конститутивну або регуляторну експресію. Регульована експресія може бути такою, що індукується або репресується, або і тією й іншою.

Переважно, коли такий другий промотор являє собою промотор IE1-гена mCMV або його фрагмент, що посилює функціональну експресію. Тому особливо переважно, щоб перший промотор являв собою IE2-промотор mCMV або його фрагмент, що посилює функціональну експресію, а другий промотор являв собою IE1-промотор mCMV або його фрагмент, що посилює функціональну експресію.

IE1-промотор mCMV відомий, наприклад, з WO 87/03905. Він може включати в себе коровий промотор, що містить останні 47 п.о. з послідовності на Фіг.1 (в рамці), або додаткові 100-200 п.о. ліворуч від послідовності (тобто проксимальний промотор), або він може включати в себе цілу міжгенну ділянку аж до положення -1330 (відносно положення +1 в IE1, див. Фіг.1).

У переважному варіанті здійснення даного винаходу вектор складається з ДНК-послідовності SEQ ID NO: 1, що включає в себе і IE1-, і IE2-промотор, а також IE1-енхансер і новий IE2-енхансер, або будь-який його фрагмент, що посилює функціональну експресію.

У найбільш переважному варіанті здійснення даного винаходу у векторі, що використовується відповідно до даного винаходу, промотор або його фрагмент, який посилює функціональну експресію, оперативно зв'язаний з ДНК-послідовністю, що кодує щонайменше один поліпептид. У додатковому варіанті здійснення даного винаходу енхансер згідно з винаходом присутній в експресуючому векторі разом з ДНК-послідовністю, що кодує щонайменше один поліпептид.

Переважно, щоб вказана ДНК-послідовність кодувала білок, що представляє інтерес.

Вельми переважно, якщо ДНК-послідовність кодує маркерний білок або вона являє собою ампліфікований ген.

Переважно також, якщо вказана ДНК-послідовність кодує репортерний білок.

Якщо вектор згідно з винаходом містить більше одного промотору, то будь-яке поєднання або частина поєднання білка, що представляє інтерес, маркера, репортера, ампліфікованого гена тощо може експресуватися з однієї і тієї самої плазміди.

Відповідно до даного винаходу, поліпептид, що представляє інтерес, може являти собою будь-який поліпептид, який відрізняється від власне IE2-поліпептиду, може бути позаклітинним білком, таким як пептидні гормони, або трансмембранним білком, таким як рецептори фактора росту або гормональні рецептори, або внутрішньоклітинним білком, таким як кінази, фосфатази або ДНК-зв'язуючі білки, залежно від передбачуваного використання поліпептиду, що цікавить, або від хазяйської клітини, в якій він

експресується.

Відповідно до даного винаходу, придатні маркерні білки являють собою, наприклад, негативні або позитивні селективні маркери або ампліфіковані гени. Приклади включають в себе білки, вибрані з аденозиндезамінази (ADA), аміноглікозидфосфотрансферази (neo), дигідрофолатредуктази (DHFR), гігromіцин-В-фосфотрансферази (HPR), тимідинкінази (tk), ксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази (gpt), фактора множинної лікарської стійкості (MDR), орнітиндекарбоксилази (ODC) та фактора N-(фосфоноацетил)-L-аспартатрезистентності (CAD), або пуроміцинацетилтрансферази (PAC). Додаткові приклади включають в себе гени, що використовуються для селекції при використанні окремих метаболічних шляхів, такі як галактокіназа [Schumperli et al., 1982], рецептор фолієвої кислоти [Zhu et al., 2001] або носій відновленого фолату [Assaraf et al., 1992].

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу поліпептид, що представляє інтерес, являє собою продукт репортерного гена.

Під терміном "репортерний ген" або "репортерний білок", що використовується тут, мається на увазі ген, який кодує генний продукт, що можна ідентифікувати з використанням простих, недорогих способів або реактивів і який можна оперативно зв'язати з ділянкою промотору згідно з винаходом або з його активним фрагментом. Репортерний ген можна використовувати для визначення транскрипційної активності в скринуючих аналізах [див., наприклад, Goeddel (ред.) *Methods Enzymol.*, Vol. 185, San Diego. Academic Press, Inc. (1990)], наприклад з використанням люциферази як репортерного гена [Wood, 1991; Seliger and McElroy, 1960; de Wet et al., (1985) або комерційно доступного від Promega®].

Приклади вибрані з люциферази, зеленого флуоресціюючого білка, лужних фосфатаз, О-галактозидази, або пероксидази хіну або з внутрішньомолекулярних поєднань з іншими білками, такими, наприклад, як Зелений Флуоресціюючий Білок (GFP) або поліпшений GFP (EGFP) з пуроміциновим ацетилтрансферазним геном [Abbate et al., 2001], або з їх поєднання.

Експериментальні дані згідно з винаходом основані на тому, що ефективну, одночасну експресію поліпептидів, що цікавлять, можна здійснити з IE2- і IE1-промотору, обидва з яких представлені в одній і тій самій плазміді. У зв'язку з цим в додатковому переважному варіанті здійснення даного винаходу обидва промотори, IE2-промотор mCMV і IE1-промотор mCMV, або їх фрагменти, що посилюють функціональну експресію, відповідно, оперативно зв'язують з поліпептидом.

Високі рівні експресії можуть бути здійснені, якщо обидва промотори представлені в двоспрямованій структурі. Тому IE2-промотор mCMV, або його фрагмент, що посилює функціональну експресію, і промотор, зокрема, IE1-промотор mCMV, або його фрагмент, що посилює функціональну експресію, розташовують в двох напрямках.

Під терміном "розташований в двох напрямках", що використовується тут, мається на увазі, що дані промотори запускають транскрипцію в протилежних напрямках. Дана схема розташування плазмідної ДНК називається також "двоспрямованою структурою" даного вектора.

Промотори IE1 або IE2 mCMV-гени або їх фрагменти, що посилюють функціональну експресію, або будь-який новий промотор, який можна використовувати у поєднанні з IE2-промотором mCMV або у поєднанні з IE2-енхансером, може також включати в себе сигнал ініціації трансляції.

В іншому переважному варіанті здійснення даного винаходу IE2-промотор mCMV-гена або його фрагмент, що посилює функціональну експресію, або IE2-енхансер mCMV сполучаються з іншими елементами, що регулюють або впливають на транскрипцію. Такі елементи можуть впливати на процесинг, стабільність або трансляційну ефективність РНК. Приклади придатних елементів вибрані з групи, що складається з 5'-UTR, інтронів, 3'-UTR [див., наприклад, Mazumder et al., 2003], 3'-кінцевих процесуючих послідовностей мРНК (наприклад, сайти поліаденілування) та IRES-послідовностей для експресії поліцистронної мРНК [див., наприклад, Mountford and Smith, 1995].

Переважно використовувати IRES-елемент для експресії поліцистронних мРНК, в яких кодуєчі послідовності відділені за допомогою IRES. У цьому випадку перевагою є те, що деякі поліпептиди, які представляють інтерес, можуть експресуватися з однієї і тієї самої мРНК, і отже, з одного і того самого промотору.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу лише один IE2-промотор mCMV-гена або у поєднанні з IE1-промотором mCMV-гена, або будь-який інший природний або штучний промотор або IE2-енхансер можуть бути приєднані до додаткових послідовностей, посилюючи експресію, таких як інсуляторів, граничні елементи, LCR [описані, наприклад, у Blackwood and Kadonga (1998)] або ділянки, зв'язані з матриксом/клітинним каркасом [описані, наприклад, у Li et al., 1999].

Фахівці в даній галузі братимуть до уваги і те, що вектор згідно з винаходом може також містити додаткові енхансери, такі, наприклад, як добре відомий SV40-енхансер або hCMV-енхансер.

Відповідно до даного винаходу, поліпептид, оперативно зв'язаний з першим промотором, переважно з IE2-промотором mCMV, і поліпептид, оперативно зв'язаний з другим промотором, переважно з IE1-промотором mCMV-, може бути одним і тим самим. У цьому випадку дві копії одного і того самого гена представлені в одному і тому самому векторі, але під контролем двох різних промоторів. Саме тому представляється можливим досягнути швидкості експресії, яка перевершує експресію єдиної копії гена, що кодує поліпептид, який представляє інтерес.

В альтернативному варіанті здійснення даного винаходу поліпептид, оперативно зв'язаний з першим промотором, переважно IE2-промотором mCMV, і поліпептид, оперативно зв'язаний з другим промотором, переважно IE1-промотором mCMV, відрізняються. Тому даний винахід містить ефективний вектор для ко-експресії двох різних поліпептидів, таких як селективні маркери або білки, що представляють інтерес, ко-експресії двох або більше субодиниць одного і того самого білка або навіть різних доменів одного і того самого білка, необхідних для їх роздільної експресії, але при цьому в одній і тій самій хазяйській клітині.

Фахівцям в даній галузі техніки потрібно мати на увазі, що відповідно до даного винаходу одну і ту саму клітину можна одночасно трансфікувати декількома експресуючими векторами, які слугують для експресії безлічі білків і/або субодиниць всього комплексу мультимерних білків.

Переважно, щоб вказаний поліпептид, оперативно зв'язаний з першим промотором, наприклад, з IE2-промотором mCMV, являв собою першу субодиницю димерного або мультимерного білка, а поліпептид,

оперативно зв'язаний з другим промотором, переважно з IE1-промотором mCMV, являв собою другу субодиницю димерного або мультимерного білка. Відповідно до даного винаходу, ко-експресія двох субодиниць димерного білка є переважною. Ко-експресія двох субодиниць одного і того самого білка є особливо переважною, оскільки експресія з обох промоторів може призвести до утворення схожих кількостей субодиниць або заданих співвідношень обох поліпептидів, залежно від сили промоторів, що використовуються. Потім ці субодиниці можна зібрати в одній і тій самій клітині для створення зрілого білка.

Переважні приклади димерних білків, придатних для експресії з використанням вектора згідно з винаходом, являють собою альфа-ланцюг і бета-ланцюг пептидного гормону, такого як FSH людини, LH людини, TSH людини і CG людини. Відповідно до даного винаходу, будь-яку з двох субодиниць можна приєднати до промотору, переважно до IE2-промотору mCMV. Фахівцям в даній галузі потрібно мати на увазі, що, відповідно до даного винаходу, в рівній мірі можна використовувати гормони інших видів тварин, таких як кінь або свиня, а також бичачі гормони, залежно від мети використання даного рекомбінантного поліпептиду.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу перша субодиниця являє собою важкий ланцюг, а друга субодиниця являє собою легкий ланцюг імуноглобуліну, або навпаки. Переважним прикладом придатного імуноглобуліну є IgG. Для терапевтичного використання такі імуноглобуліни можуть, наприклад, являти собою гуманізовані антитіла або людські антитіла. Найбільш переважним прикладом такого гуманізованого антитіла є гуманізоване анти-CB11-антитіло з торговою назвою Raptiva®.

Багато поліпептидів, що представляють інтерес, можуть експресуватися з використанням вектора згідно з винаходом. У переважних варіантах здійснення даного винаходу поліпептид вибирають з групи, що складається з хоріонічного гонадотропіну, фолікулостимулюючого гормону, лютеїнізуючого хоріонічного гонадотропного гормону, тиреотропіну, людського соматотропіну, інтерферону (наприклад, інтерферон бета-1а, інтерферон бета-1b), рецепторів інтерферону (наприклад, рецептора гама-інтерферону), TNF-рецепторів p55 і p65, інтерлейкінів (наприклад, інтерлейкіну-2, інтерлейкіну-11), білків, що зв'язують інтерлейкін (наприклад, білка, що зв'язує інтерлейкін-18), анти-CD11a-антитіл, а також мутантів, фрагментів, розчинних форм, функціональних похідних, їх злитих білків.

Інші переважні поліпептиди, що представляють інтерес, включають в себе, наприклад, еритропоетин, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор, гіпофізарні пептидні гормони, менопаузний гонадотропін, інсуліноподібні фактори росту (наприклад, соматомедин-С), фактор росту кератиноцитів, виділений з гліальних клітин нейротропний фактор, тромбомодулін, основний фактор росту фібробластів, інсулін, Фактор VIII, соматотропін, морфогенетичний білок кістки типу 2, тромбоцитарний фактор росту, гірудин, еритропоетин, рекомбінантний злитий білок LFA-3/IgG1, глюкоцереброзидаза, а також мутанти, фрагменти, розчинні форми, функціональні похідні, їх злиті білки.

Другий аспект даного винаходу відноситься до хазяйської клітини, трансфікованої щонайменше одним вектором, описаним вище. Фахівцям в даній галузі потрібно мати на увазі, що відповідно до даного винаходу хазяйську клітину можна в рівній мірі одночасно трансфікувати двома або декількома векторами.

Придатними клітинами, відповідно до даного винаходу, є багато хазяйських клітин, таких як первинні або стійкі клітинні лінії від самих різноманітних еукаріот, включаючи рослини та тваринні клітини, а також клітини ссавців або людини. Наприклад, придатні хазяйські клітини включають в себе CHO-клітини, COS-клітини, CV1-клітини, мишачі L-клітини, HT1080-клітини, BHK-21-клітини, HEK293-клітини, NIH-3T3-клітини, LM-клітини, Y1-клітини, мишачі NSO та SP2/0 гібридомні клітини та їм подібні, Namalwa-клітини, RPMI-8226-клітини, Vero-клітини, WI-38-клітини, MRC-5-клітини, або інші іморталізовані і/або трансформовані клітини.

Переважно, якщо хазяйські клітини являють собою CHO-клітини, і більш переважно, якщо вони являють собою CHO-S-клітини, описані, наприклад, Shotwell et al, [1982, J. Biol. Chem. 257:2974-2980]. CHO-клітини вперше були отримані Puck [J. Exp. Med. 108, 945, 1958] з біоплату яєчника самиці китайського хом'ячка. З даних початкових клітин був отриманий ряд субліній з різними характеристиками. Одна з цих CHO-клітинних ліній, CHO-K1 є пролінзалежною та диплоїдною по гену дигідрофолатредуктази (DHFR). Інша лінія, отримана з даної клітинної лінії, являє собою дефіцитну по DHFR CHO-клітинну лінію (CHO DUK B11) (PNAS 77, 1980, 4216-4220), яка характеризується втратою DHFR-функції внаслідок мутації одного з DFRH-гена і подальшою втратою іншого гена.

Всі ці клітини можна трансфікувати за допомогою векторів згідно з винаходом або тимчасово, або частково стійко (наприклад, якщо вектор є епісомним), або стійким (наприклад, інтегрованим в даний геном) способом. Стійка трансфекція є переважною для визначення клонів, які безперервно експресують представляючий інтерес поліпептид.

IE2-промотор згідно з винаходом або IE2-енхансер можна використовувати як регуляторні елементи в рамках способу, що зветься "Ендогенна активація гена". Вектор згідно з винаходом може містити введений геномний локус, який, як вважають, активується внаслідок гомологічної рекомбінації, оперативно зв'язуючи, таким чином, дану регуляторну послідовність (IE2-промотор і/або енхансер) з геном, що цікавить, експресія якого потребує індукції або в посилення. Даний спосіб описаний, наприклад, в WO 91/09955.

Третій аспект даного винаходу відноситься до способу отримання поліпептиду, що цікавить, який включає в себе стадію трансфекції хазяйської клітини за допомогою вектора згідно з винаходом.

Залежно від природи поліпептиду, що цікавить, використання способу відповідно до даного винаходу приводить до секретування білка або поліпептиду, який можна зібрати з супернатанта даної клітинної культури, або до отримання білка клітинної мембрани або внутрішньоклітинного білка, який можна виділити з клітин за допомогою відомих способів. Відповідний поліпептид, що виготовляється відповідно до даного винаходу, може служити для будь-чого, але переважно він являє собою терапевтичний білок, за припущенням для введення людині або тварині.

Залежно від передбачуваного використання, сама клітина, яка має інтегрований поліпептид, може бути продуктом способу, що пропонується. Така клітина може, наприклад, використовуватися в клітинній терапії.

Четвертий аспект даного винаходу відноситься до способу отримання поліпептиду, що цікавить, який включає в себе стадію культивування хазяйських клітин відповідно до даного винаходу.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу даний спосіб додатково включає в себе стадію

виділення поліпептиду, що цікавить, з хазяйських клітин або культурального супернатанта. Дана стадія дає особливу перевагу та полегшує здійснення секреції білків, які можна просто виділити з клітинного супернатанта. Разом з тим, дана стадія також застосовна для виділення поліпептидів з клітинних мембран або з внутрішньоклітинних структур, які можна виділити з хазяйських клітин.

Даний спосіб можна використовувати у тимчасовій, стійкій, епісомній або у вірусній експресуючій системах. Як показано нижче в Прикладах, вектор згідно з винаходом, отриманий у стійкій експресуючій системі, дає в результаті особливо сильну експресію необхідного білка. Тому в переважному варіанті здійснення даного винаходу трансфекція, що використовується, являє собою стійку трансфекцію.

У п'ятому аспекті даного винаходу вектор відповідно до даного винаходу використовують для експресії гена, що представляє інтерес. Такими генами можуть бути, наприклад, гени, що кодують будь-який з вищезгаданих поліпептидів. Вектор згідно з винаходом можна також використовувати для експресії маркерних генів, репортерних генів, ампліфікованих генів тощо.

Переважно даний вектор використовують для одночасної експресії двох або більше генів або кДНК, що представляють інтерес. Його можна також використовувати для спільної експресії одного гена, представляє інтерес та одного маркерного гена або репортерного гена, або ампліфікованого гена, або інших подібних генів.

У рамках даного винаходу несподівано було показано, що вектор згідно з винаходом, зокрема вектор, що містить IE2-промотор, IE2-енхансер, та IE1-промотор, отриманий при ідентифікації клонів, які вельми ефективно експресують репортерний ген і ген, що представляє інтерес. У зв'язку з цим, шостий аспект даного винаходу відноситься до використання вектора відповідно до даного винаходу для селекції клонів, які експресують великі кількості гена, що представляє інтерес.

У сьомому аспекті даний винахід відноситься до використання вектора згідно з винаходом у виробництві лікарського засобу, що використовується для плазмідної або ДНК-терапії, або генотерапії.

У восьмому аспекті хазяйську клітину згідно з винаходом використовують для виробництва лікарського засобу для клітинної терапії. Якщо дана клітинна терапія передбачається для лікування людини, переважно, щоб хазяйська клітина являла собою клітину людини або клітинну лінію, більш переважно, щоб клітина або клітинна лінія була отримана від пацієнта, якого лікують.

Тепер, маючи в своєму розпорядженні повний опис даного винаходу, фахівцям в даній галузі потрібно мати на увазі, що це саме можна здійснити в широких межах еквівалентних параметрів, концентрацій і умов, що не виходять за рамки суті та змісту даного винаходу та без зайвого експериментування.

Хоча даний винахід описаний у зв'язку з конкретними варіантами його здійснення, очевидно, що він піддається додатковим модифікаціям. Під даною заявкою маєтись на увазі внесення будь-яких змін, призначень або переробок даного винаходу, які в загальному плані наслідують принципи даного винаходу, і в тому числі таких відхилень від суті даного винаходу, які знаходяться в рамках відомої або звичайної практики в межах галузі, до якої відноситься даний винахід, і які можуть бути застосовані до сформульованих вище істотних ознак, також як і в рамках нижченаведеної формули винаходу.

Всі посилання, що цитуються тут, в тому числі журнальні статті та реферати, опубліковані або неопубліковані патентні заявки США або іноземні, видані патенти США або іноземні патенти, або будь-які інші посилання повністю включені тут за допомогою посилань, включаючи всі дані, таблиці, креслення та текст, представлені в посиланнях, що цитуються. Крім того, повний зміст посилань, що цитуються, в рамках посилань, що цитуються тут, також повністю включений за допомогою посилання.

Посилання на відомі стадії способу, традиційні стадії способу, відомі способи або традиційні способи ніяким чином не повинні розцінюватися так, що яким би то не був аспект, опис або варіант здійснення даного винаходу вже розкритий, відомий або запропонований в даній галузі.

Попередній опис конкретних варіантів здійснення даного винаходу повинен так повно виявляти основну природу даного винаходу, що інші, застосовуючи знання в рамках даної галузі (у тому числі зміст посилань, що цитуються тут), легко зможуть модифікувати і/або адаптувати для різних застосувань такі конкретні варіанти здійснення даного винаходу, без зайвого експериментування, не виходячи за рамки загального задуму даного винаходу. Тому під такими переробками та модифікаціями мають на увазі в рамках значення та діапазону рівноцінні варіанти здійснення даного винаходу, які розкриваються, що базуються на вказівках і додержанні вказівок, представлених тут. Очевидно, потрібно мати на увазі, що фразеологія або термінологія даного документа призначені для опису, але не обмежуються ним, так що термінологія або фразеологія опису даного винаходу призначаються для інтерпретації фахівцями в даній галузі в світлі викладених тут вказівок, нарівні з загальними відомостями фахівців в даній галузі.

Приклади

Приклад 1: Оцінка придатності експресуючих векторів для тимчасової трансфекції

Матеріали і методи:

Матеріали

Клітини: CHO-S, джерело Gibco/Invitrogen (Cat no 11619)

Плазмідні ДНК, сконструйовані, як зазначено на Фіг.2 і 3, виділяють з стандартно вирощуваних нічних культур за допомогою набору Nucleobond PC 500, відповідно до протоколу виробника.

Трансфекція

Ліпофектамін (Invitrogen, Cat No 18324-012)

Посуд: 24-ямкові планшети

Клітини: CHO-S клітини в експоненційній фазі росту пасивують 24 год. перед трансфекцією. Щоб виключити стаціонарну фазу при низькій щільності клітин, клітини розбавляють до концентрації $0,75 \times 10^6$ клітин/мл. Сумарна кількість для трансфекції становила $1,5 \times 10^5$ клітин, ресуспендованих в 100мкл безсироваткового середовища SFM II (Invitrogen, Cat No 12052-114) на ямку, для 24-ямкового планшета.

Трансфекційні суміші були наступними:

А) Ліпофектамін: 2мкл

SFM II-середовище: 48мкл

Загальний об'єм дорівнює 50мкл

В) Аліквоти ДНК: 1мкг (50нг експресуючого вектора+950нг плазмідно-носія, pBluescript II KS(+),

Stratagene, cat. 212205-01

SFM II-середовище: доповнювати до 50мл.

Розчини А і В змішують та інкубують протягом 30хв. при кімнатній температурі. Дану суміш підливають до 100мл SFM II-середовища, що містить $1,5 \times 10^5$ клітин. Дані клітини знову ставлять в інкубатор та інкубують при 37°C, 5% CO₂ протягом 3год. Потім додають 400мл SFM II-середовища для розбавлення ліпофектаміну. Протягом подальших 48год. клітини повторно інкубують перед відбором проб для аналізу. Кожну трансфекцію здійснюють тричі.

Вимірювання люциферази

Аналітичну систему Bright-Glo Luciferase від Promega, Cat No E2610, використовують для вимірювання люциферази, відповідно до вказівок виробника.

Коротко, суспензію клітин гомогенізують, піпетуючи декілька разів, відбирають аліквоту в 50мл і вносять її в білий 96-ямковий планшет (Nunc, Cat no 236108). Потім додають перерозчинений Bright-Glo-реагент та інкубують протягом 5хв. при кімнатній температурі. Світлове випромінювання вимірюють за допомогою люмінометра Centro LB 960 (Berthold Technologies) протягом 5сек.

Результати

Конструкції експресуючих векторів, що використовуються у тимчасовій експресуючій системі на основі CHO-S-клітин, зображені на Фіг.2. У даній серії експериментів люциферазу використовують як репортерний ген для оцінки генної експресії. Вектори, що не мають який-небудь промотор взагалі (конструкція А) або SV40-промотор/енхансер (конструкція В), яка не є дуже активною в CHO-S-клітинах, використовують для контролю.

Результати експериментів по тимчасовій трансфекції з векторами А-Г подані на Фіг.4. У конструкціях С і F експресія люциферази керується промотором IE1. Обидві конструкції забезпечують експресію люциферази. Конструкція С, що додатково містить IE2-промотор, розташовується в двох протилежних напрямках по відношенню до IE1-промотору. Дане двоспрямоване розташування зменшує ефективність експресії з IE1-промотору (конструкція С), у порівнянні з використанням одного лише IE1-промотору (конструкція F). Короткий варіант в 0,68 п.о. IE1-промотору (конструкція G) був менш ефективним, ніж його довгий варіант (конструкція F).

Незалежно від присутності або відсутності другого промотору в одній і тій самій конструкції, IE2-промотор ефективно запускає експресію люциферази (конструкції D і E), і тому може використовуватися як промоторний елемент в експресуючих векторах для експресії поліпептиду, що цікавить.

У протилежності IE1-промотору, IE2-промотор, взятий окремо (конструкція E), менш ефективний, ніж при його використанні в двоспрямованій структурі (конструкція D). Тому він особливо підходить для використання в двоспрямованих експресуючих векторах.

Приклад 2: Оцінка придатності експресуючих векторів у стійкій трансфекції

Матеріали і методи

Методи

Клітини: CHO-S, від Gibco/Invitrogen (Cat no 11619)

Плазмідні ДНК (відповідно до Фіг.2) виділяють з стандартно вирощуваних нічних культур за допомогою набору Nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel Cat. No 740574) відповідно до протоколу виробника.

Трансфекція

Ліпофектамін (Invitrogen, Cat No 18324-012)

Для здійснення стійкої трансфекції використовують колби T75. Клітини CHO-S, що знаходяться в експоненційній фазі росту, пасивують за 24год. до трансфекції. Щоб виключити стаціонарну фазу при низькій щільності клітин, останні розбавляють до концентрації $0,75 \times 10^6$ клітин/мл. Сумарну кількість трансфікованих клітин, рівну 5×10^6 , ресуспендують в 7мл середовища SFM II (Invitrogen Cat no 12052-114) в колбі T75.

Використовували наступні суміші для трансфекції:

А) Ліпофектамін: 52,1мл

Середовище SFM II: 517,9мл

Загальний об'єм становить 570мл.

В) Аліквоти ДНК: 10мг лінеаризованої плазмідної ДНК (9мкг Luc-експресуючого вектора+1мкг плазміді для селекції: SV40-промотор, що керує геном стійкості до пуроміцину. Все плазміді лінеаризують за допомогою PvuI).

Об'єм доводять до 570мл середовищем SFM II.

Розчини А і В змішують та інкубують протягом 30хв. при кімнатній температурі. Підливають 7мл, що містять 5×10^6 клітин, і потім знову вміщують в інкубатор при 37°C і 5% CO₂ на 3год. Потім інкубовану культуру центрифугують при 800g протягом 3хв., і клітинний осад ресуспендують в 5мл EX-CELL 325 (JRH, Cat no 14335-1000M), з додаванням 1X HT і 4,5мМ L-глутаміну (100X HT, Invitrogen, Cat. no 11067-030, 200мМ L-глутаміну, Sigma, G-7513). 5мл EX-CELL 325 додають безпосередньо в колбу T75 для того, щоб ресуспендувати прилиплі клітини, які додаються до наявної суспензії. У результаті, в 10мл середовища EX-CELL 325 знаходиться 5×10^6 клітин.

Методика відбору:

Через 48год. після трансфекції здійснюють селекцію, змінюючи середовище та розбавляючи клітини до концентрації 1×10^6 клітин/мл в середовищі EX-CELL 325, що містить 10мкг/мл пуроміцину (Sigma, P-8833). Кожні два дні клітини підраховують, центрифугують, і ресуспендують в свіжому селективному середовищі до концентрації 1×10^8 живих клітин/мл. У ці самі дні здійснюють контроль життєздатності. Після 21-35 днів селекцію завершують, і життєздатність клітин перевищує 80%.

Вимірювання люциферази

За дві години до відбору культуральних проб клітини підраховують і дану культуру розбавляють до концентрації $0,2 \times 10^8$ живих клітин/мл.

Вимірювання люциферази здійснюють за допомогою аналітичної системи Bright-Glo Luciferase від Promega, Cat No E2610 відповідно до вказівок виробника.

Коротко, клітини суспендують шляхом неодноразового їх піпетування, після чого беруть аліквоту в 50мкл і вміщують її в білий 96-ячковий планшет (Nunc, Cat no 236108). Приливають 50мкл перерозчиненого Bright-Glo-реагенту та інкубують протягом 5хв. при кімнатній температурі. Люмінометром Centre LB 960 (Berthold Technologies) протягом 5сек. в досліді вимірюють світлове випромінювання.

Потім активність люциферази стандартизують шляхом підрахунку живих клітин в зразку, що випробовується, тобто, як правило, 1×10^4 клітин.

Результати

Конструкції C, D, E і F (див. Фіг.2) тестують в стійкій експресуючій системі. Отримані результати зображені на Фіг.5. Конструкція E, що містить тільки IE2-промотор, приводить до найсильнішої експресії люциферази в даній системі. При спільній присутності IE1-промотору і IE2-промотору, розміщених в двох протилежних напрямках (конструкція D), IE2-промотор все ще забезпечує експресію люциферази, що перевищує експресію під промотором IE1, або при окремій його присутності (конструкція F), або в двоспрямованому положенні з IE2-промотором (конструкція C).

Приклад 3: Ко-експресія двох поліпептидів, що представляють інтерес, в двоспрямованих експресуючих векторах.

Матеріали і методи:

Трансфекцію здійснюють так, як описано в Прикладах 1 і 2. Коротко, CHO-S-клітини (в суспензії, Gibco SFMI) були тимчасово трансфіковані за допомогою 900, 500, 300 і 100нг векторної ДНК (конструкція C-2, див. Фіг.3) в 24-ячкових планшетах (тричі для кожної обробки). Через два дні після трансфекції здійснюють аналіз люциферази з клітинними екстрактами в трьох повторях, який виражають за допомогою RLU (відносні одиниці світла). Перед лізисом клітин були взяті супернатанти з однієї і тієї самої ямки, об'єднані та проаналізовані на IL18BP за допомогою ІФА (див. нижче).

ІФА IL-18BP

Кількість рекомбінантного людського IL-18BP (rhIL-18BP) в супернатанті вимірюють за допомогою стандартного ІФА з використанням виділених очищенням білком G моноклональних анти-rh-IL-18BP-антитіл, кон'югованих з біотином. Екстравідін-HRP (Sigma) використовують як детектуючий реагент.

На Фіг.9 показані кількості IL-18BP в нг/мл і люциферази в RLU, експресовані в 48 клонах на 90-й день після стійкої трансфекції за допомогою двоспрямованої mCMV-промоторної конструкції (див. Фіг.3). Межа виявлення для люциферази складає приблизно 500 RLU, і 2,5нг/мл - для IL-18BP.

Результати

У даній серії експериментів проаналізована експресія двох генів, що знаходяться в конструкції C-2, зображеній на Фіг.3. Маркерний ген (Люцифераза) експресується з IE2-промотору, а ген, що представляє інтерес, ген IL-18BP, експресується з промотору IE2. IL-18BP являє собою секретований білок. Промотори вбудовані в двоспрямовану структуру, тобто, обидва промотори одночасно запускають експресію в протилежних напрямках.

Результати даного дослідження зображені на Фіг.6-9. На Фіг.6 показана величина люциферазної експресії, яка виміряна в RLU у тимчасовій експресуючій системі. У тій самій тимчасовій експресуючій системі за допомогою ІФА вимірюють IL-18BP в супернатантах клітинних культур. На Фіг.7 показані результати секреції білка IL-18BP в нг/мл. На Фіг.8 показане співвідношення IL-18BP і люциферази в кожному експерименті.

Як показано на Фіг.6-8, для трансфекції використовують різні кількості плазмідної ДНК. Всі використані кількості ДНК призводять до експресії як люциферази, так і IL-18BP. Вражає, але найкращі результати отримані при трансфекції найменшою кількістю ДНК, а саме 100нг векторної ДНК, і цей результат однаковий і для IL-18BP, і для люциферази.

Більше того, цей стабільний показник (Фіг.8) свідчить про константне співвідношення потенційної експресії обох промоторів.

Нарешті, ці дані демонструють, що обидва гени експресуються одночасно з двох промоторних одиниць, показуючи також, що обидві експресуючі одиниці повністю функціональні в двоспрямованій промоторній структурі.

Далі, стійко трансфікують конструкцію C-2, а експресію люциферази і IL-18BP аналізують в 48 незалежних клонах.

Стійку трансфекцію здійснюють відповідно до протоколу, описаного в прикладі 2, за тим винятком, що середовище, яке використовується після трансфекції, являє собою ProCho5 (Cambrex, cat. 12766Q).

Що стосується клонування поодинокі клітини, даний пул упорядковують в 384-ячковому планшеті (Nunc, cat. 164688) з щільністю 0,5 клітин на ямку (70мкл/ямку) з використанням диспенсера Multidrop (ThermoLabsystems, cat. 5840150). Через 8 днів випадковим чином відбирають 192 клон та аналізують люциферазну експресію. Відбирають 48 клонів з найвищою Luc-експресією, які перевіряють на експресію люциферази (люмінометром) та на IL-18BP (неавтоматизований ІФА, див. вище).

На Фіг.9 представлені результати даного експерименту. Всі 48 клонів експресують люциферазу і IL-18BP, хоч і в різній кількості.

Приклад 4: Визначення мінімальної енансерної послідовності

Матеріали і методи

Плазмідні ДНК

Набір векторів, що містять укорочені mCMV-промотори, створений з використанням ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) та специфічних для mCMVp праймерів (Таблиця).

Умови ПЛР були наступними:

Суміш:

10нг плазмідної ДНК (prevmCMV-Luciferase (Δ Xhol), конструкція E на Фіг.2)

50пкмоль смислового та антисмислового праймера (див. нижче таблицю 1, звичайний антисмисловий праймер для всіх)

200мкМ кожного dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

1x Dynazyme-буфер, що містить 1,5мМ MgCl₂

4 одиниці ДНК-полімерази Dynazyme II (Finnzymes, cat. F-501S)

Характеристика циклів:

95°C, 5'

2 цикли:

95°C, 30"

52°C, 30"

72°C, 1'30"

2 цикли:

95°C, 30"

54°C, 30"

72°C, 1'30"

10 циклів:

95°C, 30"

58°C, 30"

72°C, 1'30"

15 циклів:

95°C, 30"

60°C, 30"

72°C, 1'30"

5мкл ампліфікату з кожної ПЛР-реакції вміщують в 1%-вий агарозний гель. Перед клонуванням вирізають смуги, що мають потрібну довжину, та піддають виділенню очищенням з використанням набору Qiagen Minilute Gel Extraction, cat. 28606.

Таблиця

Положення	Праймер
-1076	CCGCTCGAGACCTTATGTACGTGCCA
-783	CCGCTCGAGCTCCAATGGAACCTTCCTG
-587	CCGCTCGAGACTTTCCTGTTGATTCACC
-387	CCGCTCGAGCAAAACCCAGTGGAAAGTC
-189	CCGCTCGAGATGCCATATGAGTGTATTAG
IE1-IE2as	CGGAATTCGATATCCGCGGTCTC

Положення, що кореспондують з числом пар основ, взятих з mCMVp, розглядаючи +1 з IE2 як початок відліку, являють собою: -1076, -783, -587, -387 і -189.

Метод клонування для будь-якого промоторного фрагмента був одним і тим самим, ПЛР виконують в повну довжину mCMVp (prevmCMV-Luciferase (Δ XhoI), тобто, конструкція E на Фіг.2). Потім дані фрагменти обробляють за допомогою XhoI/ExoRI, додають два сайти рестрикції по краях специфічної праймерної послідовності. Потім з конструкції E видаляють промоторну послідовність шляхом обробки її за допомогою XhoI/ExoRI та укорочені варіанти вбудовують в той самий локус.

Оцінку конструкцій здійснюють за допомогою тимчасової трансфекції ліпофектаміном з подальшим вимірюванням люциферази. Додаткові матеріали і методи описані в Прикладі 1. SFM-середовище, що використовується в даному прикладі, являє собою ProCho5, Cambrex, B-12766Q.

Результати

Вектори H-N (Фіг.10.a), що містять IE2-промотор mCMV, що приводять в дію люциферазний ген, були сконструйовані для того, щоб визначити мінімальні послідовності, необхідні для високого експресуючого рівня з IE2-промотору.

Сім конструкцій H-N експресуючих векторів використовують для тимчасової експресуючої системи, заснованої на CHO-S-клітинах. Отримані результати зображені на Фігурі 10.b). Конструкція L являє собою найкоротшу конструкцію, що зберігає сильну експресію люциферази в даній системі. Конструкція M все ще призводить до експресії люциферази на рівні, відповідному 30% рівня експресії, що досягаються за допомогою конструкцій H-L. Експресія люциферази, що отримується за допомогою конструкції N, виявляється дуже низькою, але все ж істотною, що свідчить про базальну промоторну активність, чого і потрібно було очікувати для продуктивного сайту ініціації транскрипції, який містить ТАТА-бокс та ініціатор.

Нарешті, дані експерименти визначають новий енхансер, розташований ліворуч від IE2 mCMV, що називається тут IE2-енхансер mCMV. У вищезгаданих експериментах IE2-енхансер збільшує транскрипцію з мінімального IE2-промотору, що зберігається в конструкції N. Мінімальна послідовність, необхідна для високої експресії репортерного гена, знаходиться в межах фрагмента від -587 до -189 п.о. (конструкція L), і в межах конструкції, що містить фрагмент від -387 до -189, що все ще посилює експресію люциферази (конструкція M).

Приклад 5: Новий IE2-енхансер активує мінімальний SV40-промотор

Додаткові експерименти здійснюють для того, щоб з'ясувати, чи дійсно новий IE2-енхансер насправді задовольняє всі критерії, необхідні для енхансерної активності, тобто, посилює експресію, незалежно від (1) місцерозташування, (2) орієнтації, і (3) промоторної ідентичності. Для цього були сконструйовані конструкції O-V з метою з'ясувати, чи може новий IE2-енхансер посилювати експресію гетерологічного промотору, SV40-промотору, незалежно від орієнтації, відстані та положень (5' або 3') відносно SV40-промотора. Конструкції W, X, і Y слугують контролем, W містить SV40-енхансер, X містить SV40-промотор і не містить якого-небудь енхансера, а Y не містить ні енхансера, ні промотору.

Конструкція вектора

Вектор, що називається pSV-Luc (конструкція X на Фігурі 11(a)), який містить лише SV40-промотор, був сконструйований з pGL3-Ctrl (Promega, E 1741), що містить SV40-промотор, що приводить до дії люциферазний ген, а також SV40-енхансер, локалізований на 3'-кінці даного гена (конструкція W), і pGL3-

Basic (Promega, E1751), що не містить ні промотору, ні енхансера (конструкція Y).

Коротко, pGL3-ctrl розрізають за допомогою NotI/XbaI, щоб виділити фрагмент, що містить SV40-промотор з подальшим люциферазним геном. Аналогічним способом розрізають pGL3 -basic за допомогою NotI/XbaI і виділяють векторний кістяк без енхансера, але такий, що містить poly A-ділянку. У результаті об'єднання двох фрагментів отримують pSV-Luc (конструкція X).

5'-ділянка SV40-промотору даного вектора створена шляхом клонування IE2-енхансерної послідовності (від -587 до -189) в обох орієнтаціях, названа p5'enh-SV-Luc (конструкція O), і p5'-зворотньоорієнтованої послідовності enh-SV-Luc (конструкція Q). Крім того, дану IE2-енхансерну послідовність (від -587 до -189) також клонують в обох орієнтаціях в 3'-ділянці люциферазного гена. Отримані вектори були названі p3'enh-SV-Luc+ (конструкція S), і p3'-зворотньоорієнтований enh-SV.Luc. (конструкція U).

Таку саму процедуру здійснюють з коротким варіантом IE2-енхансером, а саме, таким, що займає позицію від -387 до -189 замість положення від -587 до -189, і отримують конструкції P, R, T і V, див. Фіг.11а.

Конструювання O, P: Реципієнтний вектор являє собою pSV-Luc+ (конструкція X з Фіг.11.а), лінеаризований за допомогою обробки NheI/SmaI. Повнорозмірний енхансер виділяють шляхом обробки NdeI і подальшою реакцією затуплення по кінцях з використанням полімерази Кленова, з подальшим очищенням і обробкою NheI. Такий самий підхід застосовують для створення короткої енхансерної конструкції.

Конструювання Q, R: Реципієнтний вектор являє собою pSV-Luc+ (конструкція X з Фіг.11.а), лінеаризований обробкою за допомогою XhoI/SmaI. Повнорозмірний енхансер виділяють шляхом обробки за допомогою NdeI і подальшою реакцією затуплення кінців з використанням полімерази Кленова, очищенням і обробкою за допомогою XhoI. Такий самий підхід застосовують для створення короткої енхансерної конструкції.

Конструювання S, T, U і V: Реципієнтний вектор являє собою pSV-Luc+ (конструкція X з Фіг.11.а), що розкривається обробкою за допомогою BamHI, і подальшим затупленням кінців з використанням полімерази Кленова. Повнорозмірний енхансер виділяють обробкою за допомогою NdeI/NheI, і подальшою реакцією затуплення кінців з використанням полімерази Кленова. Клонування здійснюють в обох орієнтаціях, які ідентифікують за допомогою рестрикційного аналізу. Обидві конструкції з різними орієнтаціями залишають для аналізу. Такий самий підхід застосовують для створення короткої енхансерної конструкції.

Конструювання pGL3-Basic (конструкція Y) слугує як контроль відсутності експресії. PGL3ctrl (конструкція W) слугує як SV40-промотор/енхансерний вектор. pSV-Luc є контролем, що має тільки SV40-промотор (конструкція X).

Вимірювання трансфекції та люциферази здійснюють як попередні приклади.

Результати

Результати, отримані для конструкцій O-Y з Фіг.11.а, зображені на Фіг.11.б. Конструкція, що містить SV40-промотор з відсутністю енхансерної активності, взята як початковий рівень енхансерної активності, яка додається, а активність, що вимірюється за допомогою конструкції X, задається у вигляді 1. Усі конструкції, що мають або довгий, або короткий IE2-енхансер, забезпечують експресію репортерного гена. Довгий варіант конструкції стійко забезпечує високу експресію репортерного гена з SV40-промотору, яка виявляється набагато вищою за ту, яку отримують при об'єднанні SV40-промотора і SV40-енхансера (конструкція O). Внаслідок цього даний експеримент чітко визначає послідовність від -587 до -189 і послідовність від -387 до 189 як справжніх енхансерів, що активують гетерологічний промотор незалежно від положення та орієнтації.

Приклад 6: порівняння довгого IE2-енхансерного варіанта (від -587 до -189) і hCMV-енхансера.

Протоколи експериментів по трансфекції ліпофектаміном з подальшим вимірюванням люциферази, описані в Прикладі 1.

Результати

У даному експерименті конструкції O та Q, що мають довгий варіант нового IE2-енхансера в обох напрямках в 5'SV40-промоторі, використовують для порівняння з відомим сильним енхансером, hCMV (людський цитомегаловірус)-енхансером. На цьому кінці IE2-послідовність mCMV заміняють hCMV-енхансерною послідовністю (SEQ ID NO: 2) в конструкції O, отримуючи таким чином конструкцію O-2. Те ж саме зроблено з конструкцією Q, перетворюючи її в конструкцію Q-2.

Використана для клонування послідовність hCMV-енхансера, що має фланкуючі MluI-сайти (MluI=accsgt), має наступний вигляд:

```
aCGCGTTGACATTGATTATTTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC
ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCTAGTAACGCCAA
TAGGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
TACATCAAGTGTATCATATGSCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC
CCGCTTGGCATTATGCCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCAATCGTATATACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG
GATAGCGGTTTGAATCAACGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCACCAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCTGTAACCACTCCGCCCCACGCG
TGCTAGCCCGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG
CCCTAACTCCGCCCATCCGCCCTTAACCTCCGCCCaacgct
```

SV-Luc+ розщеплюють за допомогою MluI і обробляють лужною фосфатазою з кишечнику теляти для запобігання самолігування. Послідовність hCMV-промотору клонують в MluI-сайт. Обидва різноорієнтовані клони зберігають для порівняння з еквівалентними IE2-конструкціями.

Результати по експресії люциферази представлені на Фіг.12. Рівень експресії люциферази, отриманий з новим IE2-енхансером (довгий варіант), виявляється щонайменше вдвічі вищим за рівень експресії люциферази, отриманий за допомогою класичного hCMV-енхансера.

Приклад 7: Характеристика IE2-енхансера в двоспрямованій конструкції.

Створені дві додаткові конструкції для тестування нового енхансера в двоспрямованій структурі, названі конструкціями #26 і #140, які зображені на Фіг.13.

#26: Основу даного вектора складає послідовність mCMV-Luc+ (конструкція С, Фіг.3). Вона була створена за допомогою SacII/EcoRI. IL-18BP-касета взята з pHCMV-IL18BP2. Шляхом розрізання даного вектора за допомогою SacII/EcoRI виділяють фрагмент, що містить інтрон А, за яким ідуть відкрита рамка зчитування IL-18BP і SV40polyA-ділянка.

#140: Основу даного вектора складає конструкція L з Фіг.10.а. Він створений за допомогою XhoI/NheI, що відкривають даний вектор 5' IE2-енхансером. Вектор, експресуючий IL-18BP з IE 1-промотору, названий pBS.I IL18BP(IE1).I, використовують для вбудування як донорного. Обробляючи даний вектор за допомогою XhoI/Spel, виділяють XhoI-фрагмент, що містить IE1-промотор (див. Фіг.1), за якими іде касета інтрон А-IL18BP-SV40polyA. В отриманій конструкції бракує послідовності між -589 і XhoI-сайтом початкової mCMV-промоторної послідовності.

Стійку трансфекцію та вимірювання люциферази здійснюють, як описано в Прикладі 2, а ІФА IL18BP здійснюють, як описано в Прикладі 3.

Однак конструкція #140 не є точним відображенням конструкції #26 відносно того, що промотори IE1 і IE2 знаходяться в протилежній орієнтації. Так, експресія люциферази запускається в конструкції #26 під промотором IE1, а в конструкції #140 під промотором IE2, експресія IL18BP запускається під промотором IE2 в конструкції #26 і під промотором IE1 в конструкції #140.

Результати, отримані з обома конструкціями, представлені нижче, оскільки вони істотні для одночасної дії нового IE2-енхансера двох різних промоторів в двоспрямованому експресуючому векторі (конструкція #140).

На Фіг.14 зображені об'єднані результати по стійкій трансфекції клітин за допомогою конструкції #26 і #140 на прикладі експресії люциферази та IL-18BP. Конструкція #140 забезпечує більш високу експресію і маркерного гена (люцифераза), і гена (IL-18BP), що представляє інтерес.

Для того щоб визначити стабільність експресії люциферази і IL-18BP, сукупності клітин витримують в селективних умовах, а саме, або обробляють пуроміцином, або витримують протягом трьох тижнів без селективного тиску (без пуроміцину). Отримані результати представлені на Фіг.15-17. Рівні експресії репортерного гена люциферази та IL-18BP істотно не змінюються у часі, див. Фіг.16 і 17.

Таким чином, було продемонстровано, що обидві конструкції #26 і #140, показують аналогічні рівні експресії у часі, в присутності або за відсутності селективного тиску. Тому, конструкції, що мають новий IE2-енхансер, придатні для стійкої й одночасної експресії двох генів.

Оскільки вищенаведені результати були отримані для сукупностей, клони були отримані шляхом лімітованого розведення в концентрації 0,5 клітин на ямку з обох сукупностей.

Щоб оцінити рівні клональної експресії, клони культивують при пуроміциновому відборі. Потім виділені клони розділяють у присутності і відсутності пуроміцину, щоб згодом контролювати їх стійкість. Результати, представлені на Фіг.18 і 19, взяті до розділення клонів на середовищі з відсутністю/присутністю пуроміцину. Результати, отримані через 2 тижні після видалення пуроміцину, свідчать про незначну різницю між обома конструкціями, підтверджуючи тим самим їх стійкість. Дане дослідження було продовжене протягом подальших 10-12 тижнів.

Щоб оцінити експресію обох генів, використовують посуд з високою пропускною здатністю, а саме 96-ямкові планшети:

День 1: Розведення 1/2 клітин, що аналізуються, 100мкл культурального середовища (безсироваткового) ProCho5+100мкл свіжого ProCho5, що містить 5% навколоплідної сироватки теляти. У кінцевій концентрації 2,5% FBS клітини були здатні прикріплюватися. Був зроблений щотижневий пасаж підтримуючого планшета для фактора розведення 1/20, кожний в ProCho5-середовищі.

День 2: Видаляють середовище, одноразово промивають 200мкл 1x PBS (Invitrogen, 10010-015), після чого додають 75мкл свіжого ProCho5, що містить 5% FBS, та інкубують протягом 24год.

День 3: З кожного супернатанта відбирають 50мкл і підливають 200мкл ІФА-буфера (1x PBS, 0,1% мас./об. BSA, 0,2% Твіна 20). Аліквоту в 100мкл аналізують за допомогою ІФА на IL-18BP.

Ямка промиває 200мкл 1x PBS (відкинути) і приливають 100мкл Glo-лізуючого буфера (Promega, E266a). Дану ямку інкубують протягом 30хв. при кімнатній температурі, щоб забезпечити лізис клітин. Вимірювання люциферази здійснюють з використанням 30мкл лізованих клітин, перенесених в білий 96-ямковий планшет+30мкл перерозчиненого Bright-Glo-реагенту. Світлове випромінювання замірюють люмінометром Centre LB960 протягом 5сек. експонування.

Аналіз клонів, отриманий при стійкій трансфекції за допомогою конструкції #26, зображений на Фіг.18, а аналіз клонів при стійкій трансфекції за допомогою конструкції #140 зображений на Фіг.19.

Клони, представлені на Фіг.18 і 19, оцінюють за їх люциферазним показником низхідним способом. Експресію IL18BP виражають ОП-величиною. Оскільки ІФА здійснюють у посуді з високою пропускною здатністю, отримання % реальної кількісної оцінки рівнів IL-18BP неможливе. Однак, контролі з 2500нг/мл і 250нг/мл, а також холостий контроль включені в даний планшет для контролю змінюваності.

На Фіг.20 показана експресія люциферази, отримана за допомогою пристрою ChemiDoc. Дане зображення дає CCD-камера (Biorad), що дозволяє отримувати сигнали хемілюмінесцентного походження (як на Фіг.20). Програмне забезпечення під назвою Quantity One 4.2.3 дозволяє управляти зображенням інвертування сигналів, які були використані тут.

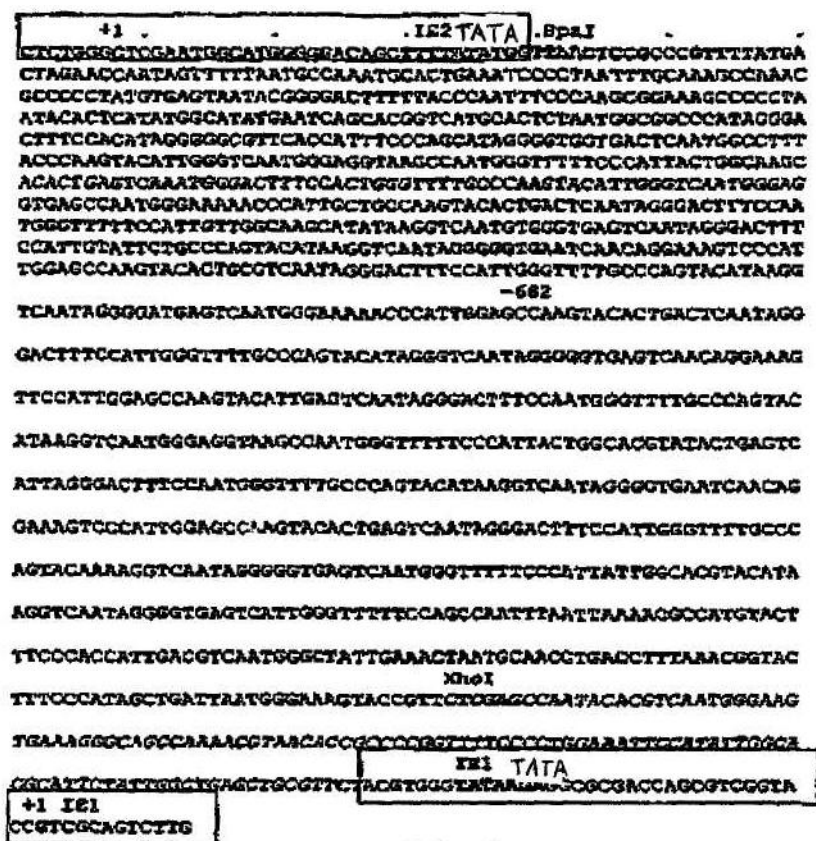
Як впливає з результатів, представлених на Фіг.18-20, конструкція #140 дає групу неекспресованих клонів. Однак дивно, що невелика частина позитивних клонів експресується обома генами надзвичайно сильно.

Тому конструкція #140 дає можливість здійснювати скринінг при дуже високій експресії на дуже ранніх стадіях клонування, і тим самим виключає необхідність тестування та доведення до кінця великого числа клонів, що зазвичай використовується для ідентифікації невеликої кількості клонів з високою експресією двох генів, що цікавлять.

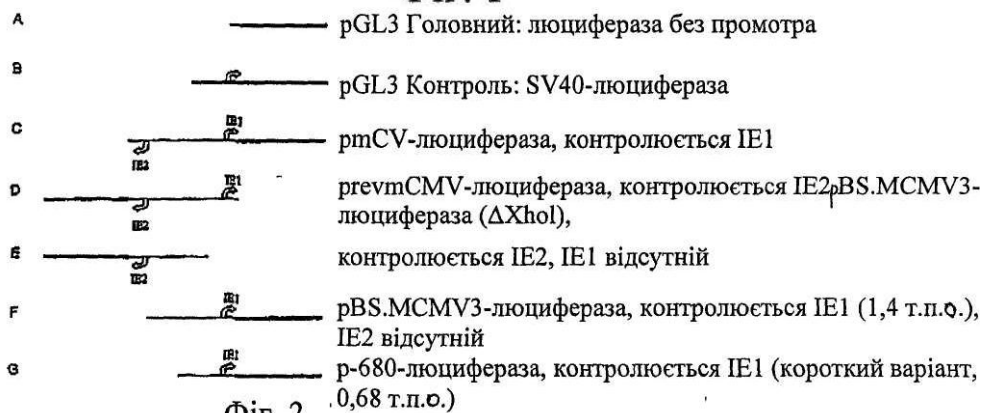
Список літератури

1. Abbate et al., Biotechniques 2001 Aug; 31(2):336-40.
2. Assaraf et al., J Biol Chem 1992 Mar 25; 267(9):5776-84.
3. Blackwood EM, Kadonaga JT. Science 1998 Jul 3; 281(5373):61-3.

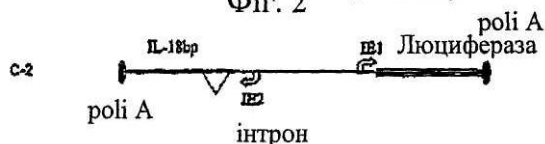
4. De Wet et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 7870.
5. Dorsch-Haesler, K. et al. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8325-8329.
6. Goeddel Methods Enzymol., Vol. 185, San Diego.
7. Li Q, Harju S, Peterson KR. Trends Genet 1999 Oct; 15(10):403-8.
8. Manning WC and Mocarski, ES, Virology 167,477-484 (1988).
9. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Trends Biochem Sci 2003 Feb; 28(2):91-8.
10. Messerle, M. et al. (1991). J. Virol. 65:1638-1643.
11. Kim, S-Y et al. (2002). J. Biotech. 93:183-187.
12. Mountford PS, Smith AG. Trends Genet 1995 May; 11(5): 179-84.
13. Sandford and Burns, Virology 222, 310-317 (1996).
14. Schumperli et al., Proc Natl Aced Sci USA 1982 Jan; 79(2):257-61.
15. Seliger and McElroy (1960) Arch. Biochem. Biophys. 88,136.
16. Shotwell et al., 1982, J. B. C 257(6), 2974-80.
17. Wood et al., (1991) Biochme. Biophys. Res. Comm. 124, 592.
18. Патент США №4963481.
19. Патент США №4968615.
20. Zhu et al., J Cell Biochem 2001 Mar 26; 81 (2):205-19.



Фіг. 1



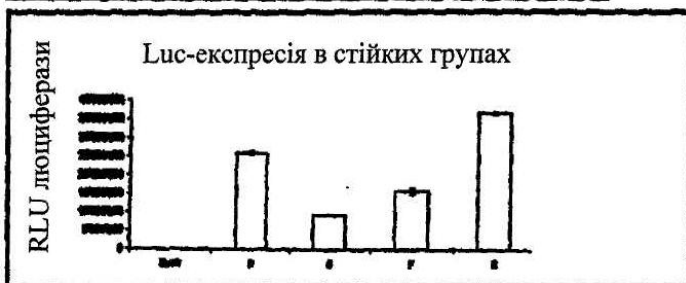
Фіг. 2



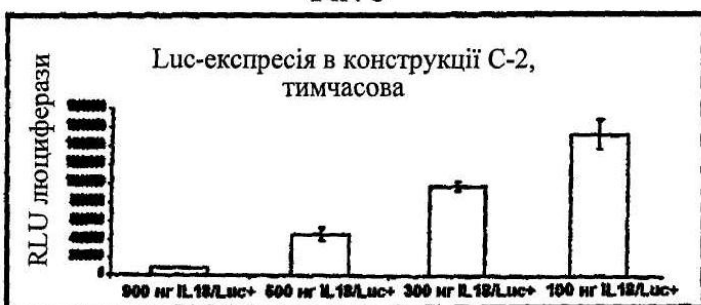
Фіг. 3



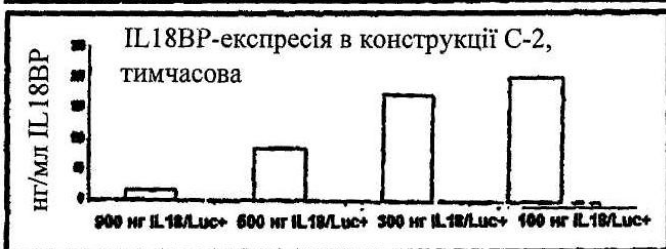
Фіг. 4



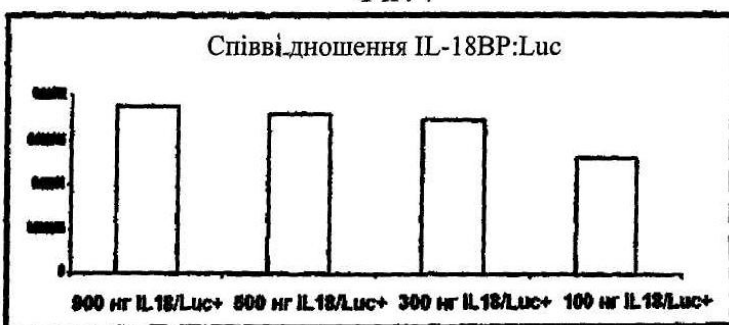
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

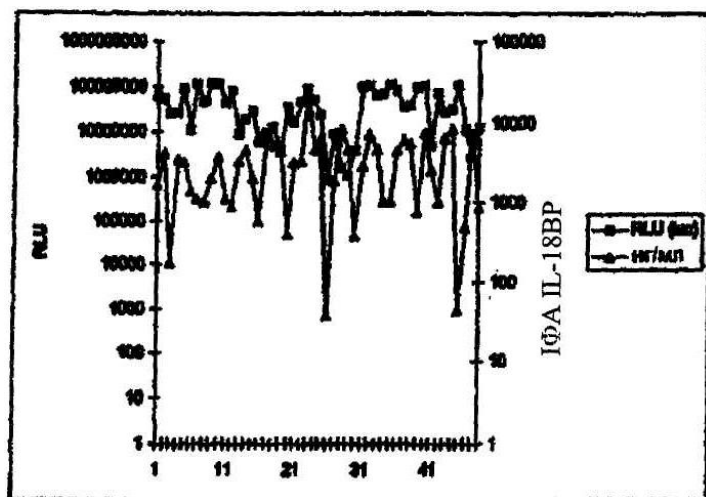


Fig. 9

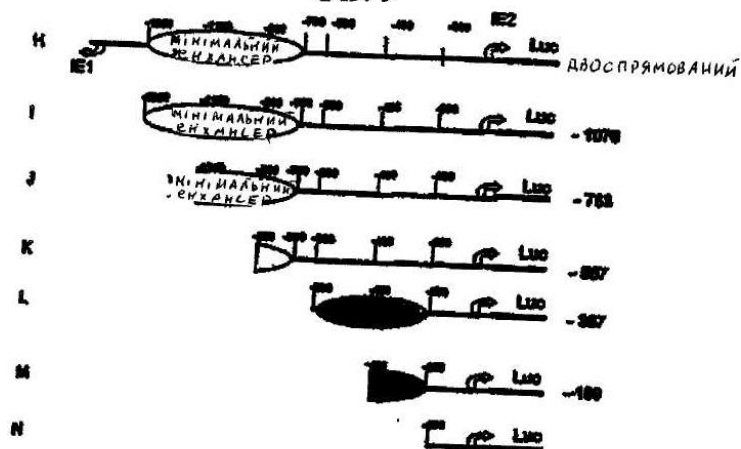


Fig. 10a

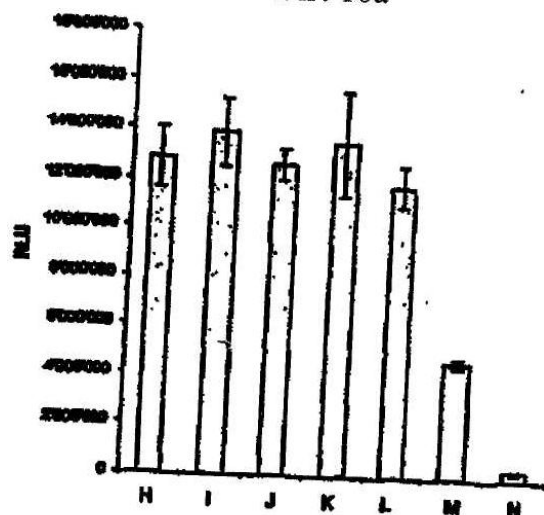
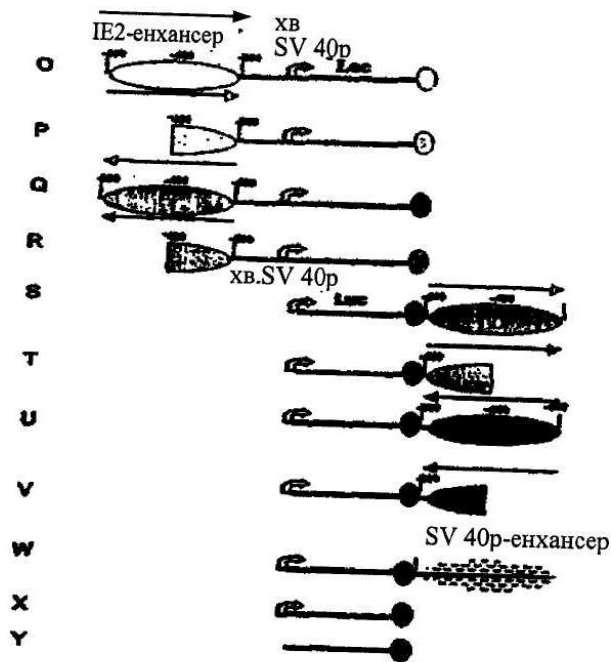
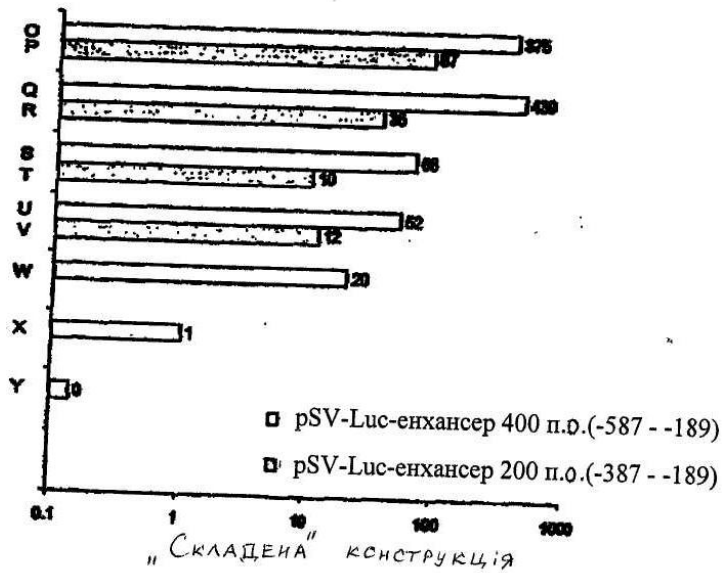


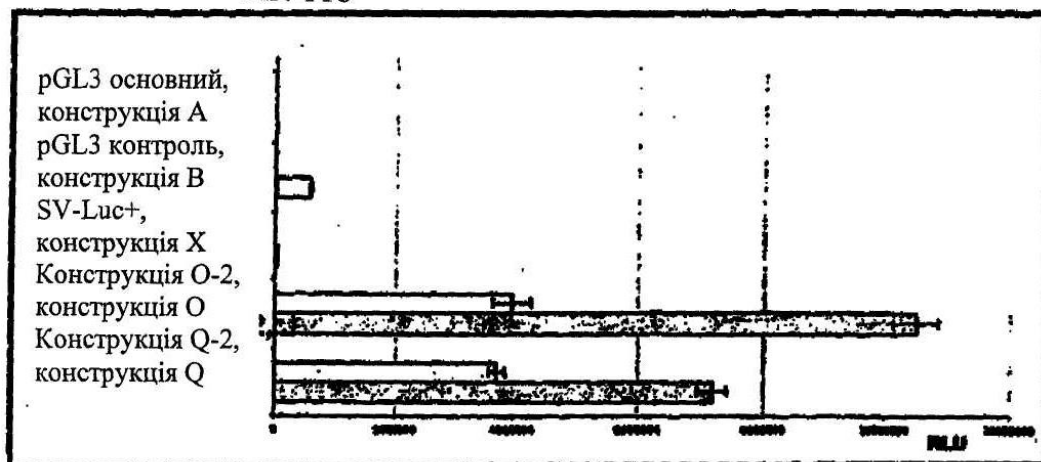
Fig. 10b



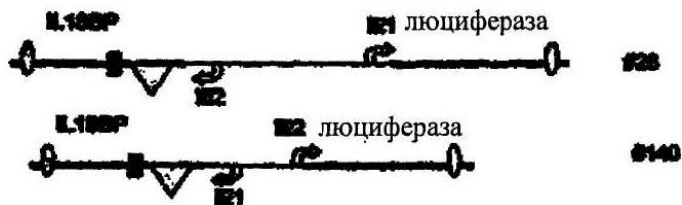
Фиг. 11a



Фиг. 11b



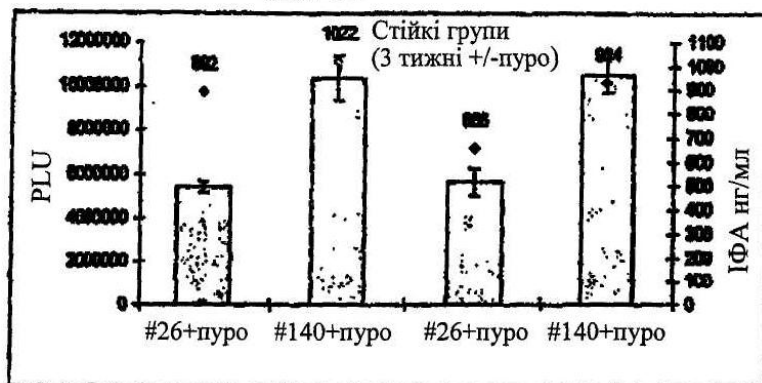
Фиг. 12



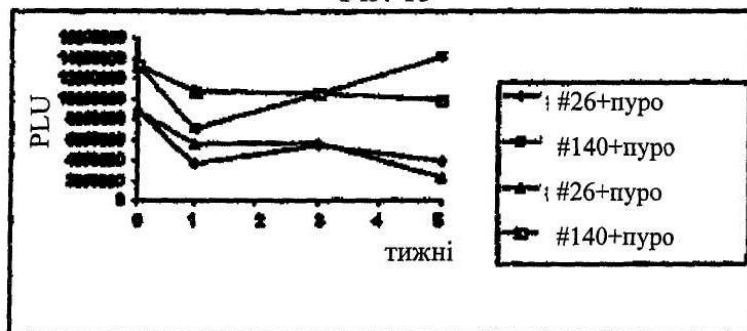
Фіг. 13



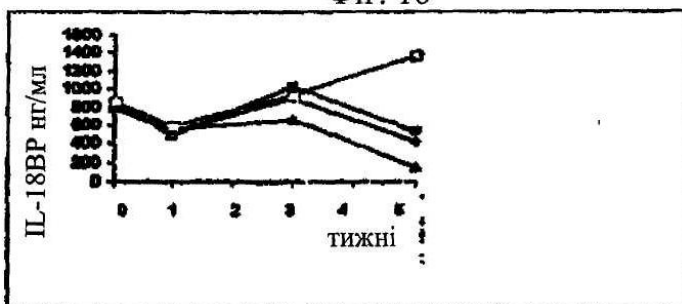
Фіг. 14



Фіг. 15

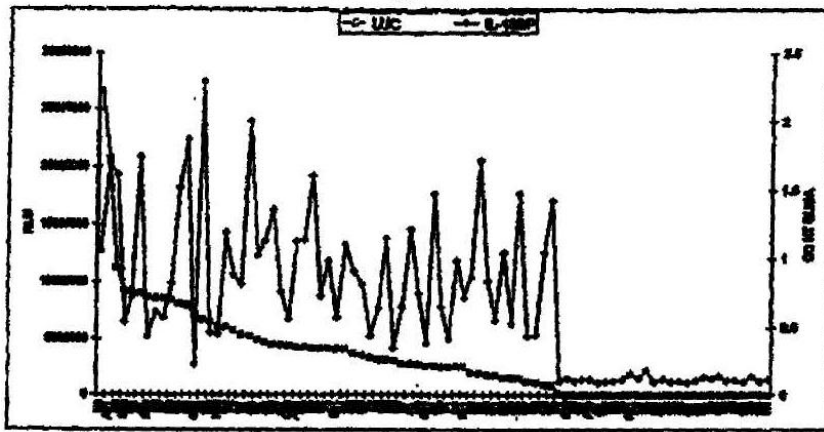


Фіг. 16

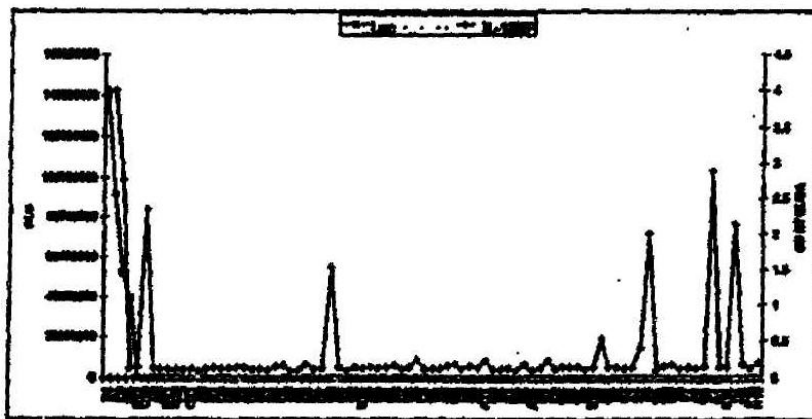


Фіг. 17

Конструкція #26



Фіг. 18
Конструкція #140



Фіг. 19



Фіг. 20