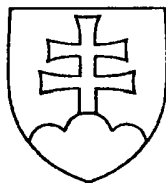


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

2312-92

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/38,
A 61 K 38/51

(22) Dátum podania: 23.07.92

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9207488.9, 9208397.1,
9115999.6, 9116000.2,
9116001.0, 9116002.8,
9116011.9

(32) Dátum priority: 06.04.92, 16.04.92, 24.07.91,
24.07.91, 24.07.91, 24.07.91,
24.07.91

(33) Krajina priority: GB, GB, GB, GB, GB, GB, GB

(43) Dátum zverejnenia: 08.03.95

(86) Číslo PCT:

(71) Prihlasovateľ: Imperial Chemical Industries PLC, London, GB;

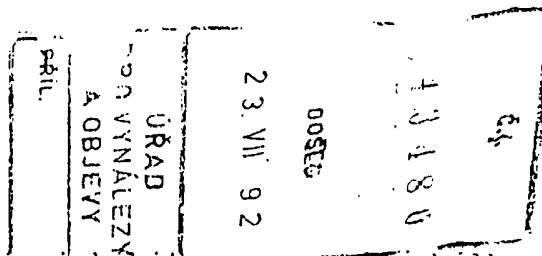
(72) Pôvodca vynálezu: Fitton John Edward, Macclesfield, GB;
Timms David, Macclesfield, GB;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Bielkoviny**

(57) Anotácia:

Opisujú sa bielkovinné analógy prírodných ribotoxínov restriktocínu, mitogillínu a alfa-sarcinínu, kde prírodný ribotoxín tak i analóg môžu štiepiť iba jednu jednoduchú fosfodiesterovú väzbu 28S rRNA v 60S ribozomálnej podjednotke, a kde analóg obsahuje iba jeden cysteín schopný kovalentne sa viazať na partnerskú látku ako na protilátku a pritom nestráca svoju biologickú účinnosť. Tento cysteín nie je prítomný v prírodnom ribotoxíne. Zvlášť výhodné analógy sú restriktocín, Cys13, Cys 82, Cys 106 a Cys 110 a restriktocín Cys 150 - Gly 151. Opisujú sa tiež odpovedajúce sekvencie DNA, vektory, hostiteľské bunky, imunotoxíny a farmaceutické prostriedky.

BÍLKOVINY



Ribotoxiny jsou účinné inhibitory syntézy bílkovin. Předpokládá se o nich, že působí jako enzymy na 28S rRNA eukaryotických ribosomů a mohou být rozděleny do dvou skupin (Jiminez, A. a kol., 1985, Ann Rev Microbiol., 39, 649-672, a Wool I.G. a kol., 1990, publikované v Hill, W.H. a kol., (ed.) The Ribosome Structure, Function and Evolution, American Society of Microbiology, Washington, DC, 203-214). Restriktocin, mitogillin a alfa-sarcin patří do třídy, která štěpí jednoduché fosfodiesterové vazby. Ricin patří do jiné třídy, která štěpí N-glykosidickou vazbu mezi basí a ribosou. Nukleotidovou sekvenci restriktocinového genu popsali Lamy, B. a Davies, J. v Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1001-1006.

Imunotoxiny jsou příkladem konjugátu, který je tvořen dvěma složkami, jmenovitě toxinem a imunoglobulinem, nebo protilátkou. Složky jsou obvykle spojeny prostřednictvím chemické spojky, avšak mohou být též spojeny přímo. Ribotoxiny jako je například restriktocin, mohou být použity jako toxinová komponenta imunotoxinů, vázaná k protilátce prostřednictvím nejrozličnějších chemických spojek. Známé metody zahrnují derivatisaci restriktocinu činidly jako iminothiolan (ačkoli i jiná derivatisační činidla např. N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionát -zde dále pod zkratkou SPDP mohou být použita) k zavedení sulfhydrylové funkční skupiny a vytvoření struktury zesítněné disulfidovými můstky s vhodně derivatisovanou protilátkou. V důsledku přirozené nahodilosti chemické derivatisace na, primárně (ačkoli ne nezbytně), aminoskupinách jako jsou např. v molekule restriktocinu, z nichž 17 obsahuje alfa aminoskupinu, vzniká heterogenní produkt, obsahující nederivatisovaný restriktocin, mono, di,

tri atd. derivatisované molekuly, které po konjugaci s protilátkou (1,2,3, atd. molů restriktocinu/mol protilátky nebo popř. 1,2, 3, atd. protilátky/mol restriktocinu) může poskytnout komplexní škálu produktů. Takový heterogenní produkt se v jednotlivých vsádkách vyznačuje nežádoucí variabilitou, která snižuje celkový výtěžek. Taková variabilita mezi výrobními šaržemi je zejména nežádoucí ve farmaceutické oblasti, kde produktem může být např. imunotoxin, jehož protilátka je selektivní k nádorům a je používán k léčení rakoviny.

Navíc chemická derivatisace může modifikovat skupiny v blízkosti aktivního centra molekuly, a tak ovlivňovat biologickou aktivitu derivatisovaného toxinu.

Předkládaný vynález se snaží překonat tyto nevýhody poskytnutím proteinového analogu s obsahem vhodné sulfhydrylové funkční skupiny umístěné tak, že určitý aminokyselinový zbytek v bílkovinné sekvenci poskytuje jediné konjugační místo v definované poloze.

Jedním z aspektů předkládaného vynálezu je poskytnutí bílkovinného analogu přírodního ribotoxinu, kde jak proteinový analog, tak nativní ribotoxin mohou štěpit pouze jedinou fosfodiesterovou vazbu 28S rRNA v 60S ribosomální podjednotce, a kde proteinový analog obsahuje pouze jediný cystein dostupný pro vznik kovalentní vazby s druhou složkou, zatímco v přírodním ribotoxinu není cystein přítomen.

Výraz "může štěpit pouze jedinou fosfodiesterovou vazbu 28S rRNA v 60S ribosomální podjednotce", tak jak je zde používán, se vztahuje na mimořádně selektivní působení třídy ribotoxinů představovaných restriktocinem, mitogillinem

a alfa-sarcinem (Wool, I.G., Jan 1984, Trends Biochem. Sci. 14-17). Proto si proteinové analogy, které jsou předmětem vynálezu zásadně podrží biologickou aktivitu ribotoxinů jako jsou restriktocin, mitogillin a alfa-sarcin. Předkládaný vynález pak dále zveřejňuje místa molekuly ribotoxinu, která mohou být modifikována podle předkládaného vynálezu bez podstatné ztráty biologické aktivity.

Nedotčené eukaryontní ribosomy mají sedimentační koeficient 80S a jsou složeny z podjednotek 60S a 40S. 60S podjednotka obsahuje 28S rRNA o délce asi 4700 nukleotidů. Alfa-sarcin poskytuje o 393 nukleotidech odvozený ze 3 konce 28S rRNA a štěpení poskytuje 3 fosfátové a 5 hydroxylové skupiny. Substrát nesmí být volná rRNA, neboť s volnou 28S rRNA toxin způsobuje rozsáhlou degradaci nukleové kyseliny. Fragment může také být vytvářen z intaktních 80S ribosomů, avšak nikoliv ze 40S ribosomálních podjednotek. Vzhledem k vysoce selektivnímu působení této třídy ribotoxinů je struktura mimořádně konservativní. Schopnost štěpit jednotlivou fosfodiesterovou vazbu 28S rRNA v 60S ribosomální podjednotce může být stanovována metodou podle Endo, Y. a Wool, I.G. (1982), J. Biol. Chem. 257, 9054-9060. Výhodně má proteinový analog nejméně 5% aktivity nativní sekvence ribotoxinu, ještě výhodněji má proteinový analog přinejmenším 10% aktivity nativní sekvence ribotoxinu a nejlépe má proteinový analog alespoň 12% aktivity nativní sekvence ribotoxinu. Aktivita je stanovována z inhibice syntesy bílkovin podle níže uvedeného odstavce 8.

Výraz "jeden cystein dostupný pro kovalentní vazbu" tak jak je zde používán znamená, že zatímco proteinový analog může anebo také nemusí obsahovat jiné molekuly cysteinu,

pouze jedna je snadno schopna vytvořit kovalentní vazbu s druhou složkou za použití konjugačních technik v oboru běžných. Obvykle nativní ribotoxin obsahuje další molekuly cysteinu které nejsou snadno dostupné ke kovalentní vazbě s druhou složkou. Cysteiny které nejsou dostupné ke kovalentní vazbě s druhou složkou mohou být například součástí disulfidických můstků nebo mohou být skryty ve středu bílkoviny nebo uvnitř hluboké povrchové štěrbiny. S výhodou je cystein dostupný pro kovalentní vazbu přítomen na povrchu bílkoviny a je výhodné nalézá-li se daleko od jakékoli oblasti spjaté s biologickou aktivitou bílkoviny jako je například aktivní centrum.

"Druhá složka" odpovídá molekule, která může být individuální molekulou nebo součástí makromolekuly, polymeru nebo pevné fáze. S výhodou je druhou složkou činidlo jako je například imunoglobulin nebo interleukin 2, které jsou schopné vázat se selektivně k tumorům, výhodněji protein který se selektivně váže k tumorům, imunoglobulin, který se váže selektivně k tumorům a zejména imunoglobulin třídy G který je schopen se vázat selektivně k tumorům. Preferovanou protilátkou pro selektivní vazbu ke kolorektálním tumorům je monoklonální protilátka C242 jak je popsána v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/01470. "Imunoglobulinem" či "protilátkou" jsou zde míněny jak celé molekuly, tak i jejich fragmenty, například známé fragmenty Fab, Fv a jednoduchý řetězec Fv (Methods in Enzymology 178, Academic Press 1989 a Bio/Technology 9, 545-551, 1991).

Výraz "nativní ribotoxin" zahrnuje ribotoxiny jak jsou nacházeny v přírodě nebo jejich rekombinantní verze a analogy takových ribotoxinů které nemají cysteiny dostupné pro

kovalentní vazbu s jinou složkou nebo nemají více než jeden cystein dostupný pro kovalentní vazbu ke druhé složce.

S výhodou jsou nativními ribotoxiny restriktocin, mitogillin a alfa-sarcin, ještě lépe restriktocin a mitogillin a zejména restriktocin. Proteinový analog může být odvozen od nativního ribotoxinu nebo od jiného analogu nativního ribotoxinu pomocí metod genového inženýrství jako například řízenou mutagenezí. Například pokud nativní ribotoxin obsahuje více než jednu molekulu cysteinu dostupnou pro kovalentní vazbu s druhou složkou, pak derivatizace analogu bude zahrnovat odstranění cysteinů až zbude pouze jeden. S výhodou však v případě, že nativní ribotoxin neobsahuje žádné cysteiny dostupné pro vazbu, derivatizace zahrnuje zabudování cysteinu. Odstranění nebo přidání cysteinu může zahrnovat substituci některé již přítomné aminokyseliny v nativním ribotoxinu. Tak může být cystein dostupný pro kovalentní vazbu získán například substitucí jednoho z cysteinů v některém neesenciálním disulfidovém můstku, čímž se druhý cystein stane dostupným pro kovalentní vazbu druhé složky. Obecně však disulfidové můstky nepředstavují preferované místo k substituci. Cystein může být také přidán prodloužením N- nebo C-konce nativního ribotoxinu či z jiného analogu nativního ribotoxinu, s výhodou o 1-50 aminokyselinách, ještě lépe o 1-40 aminokyselinách, ještě lépe o 1-30 aminokyselinách, ještě lépe o 1-20 aminokyselinách, ještě lépe o 1-10 aminokyselinách, ještě lépe o 1-5 aminokyselinách a nejlépe o dvou aminokyselinách. Proteinový analog může být také připraven prostřednictvím totální genové synthesy z oligonukleotidů. Poznatky o synthese oligonukleotidů byly shrnuty R.J. Gaitem v *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press

1984. Totální genová syntéza byla popsána M. Edwardsem v International Biotechnology Lab. 5(3) 19-25, 1987.

Výhodné analogy restriktocinu představují:

- i) analogy restriktocinu, v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 13, Lys 20, Lys 28, Lys 60, Lys 63, Lys 69, Ser 82, Lys 88, Lys 106, Lys 110 a Lys 128; a
- ii) nativní restriktocin obsahující C-koncové prodloužení Cys 150-Gly 151; a
- iii) nativní restriktocin obsahující N-koncové prodloužení Gly-Cys restriktocinu.

Obzvláště výhodné analogy restriktocinu představují:

- i) analogy restriktocinu v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 13, Ser 82, Lys 106, Lys 110; a
- ii) nativní restriktocin obsahující C-koncové prodloužení Cys 150-Gly 151.

Výhodné analogy mitogillinu představují:

- i) analogy mitogillinu v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 13, Lys 20, Lys 28, Lys 63, Lys 69, Ser 82, Lys 88, Lys 106, Lys 110 a Lys 128; a
- ii) nativní mitogillin obsahující C-koncové prodloužení Cys 150-Gly 151; a
- iii) nativní mitogillin obsahující N-koncové prodloužení Gly-Cys mitogillinu.

Obzvláště výhodné analogy mitogillinu představují:

- i) analogy mitogillinu v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 13, Ser 82, Lys 106, Lys 110; a
- ii) nativní mitogillin obsahující C-koncové prodloužení Cys 150-Gly 151.

Výhodné analogy alfa-sarcinu představují:

- i) analogy alfa-sarcinu v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 14, Lys 21, Lys 29, Lys 61, Lys 64, Lys 70, Ser 83, Lys 89, Lys 107, Lys 111 a Lys 129; a
- ii) nativní alfa-sarcin obsahující C-koncové prodloužení Cys 151-Gly 152; a
- iii) nativní alfa-sarcin obsahující N-koncové prodloužení Gly-Cys alfa-sarcinu.

Obzvláště výhodné analogy alfa-sarcinu představují:

- i) analogy alfa-sarcinu v nichž kterýkoliv z následujících aminokyselinových zbytků zahrnuje cystein: Lys 14, Ser 83, Lys 107, Lys 111; a
- ii) nativní mitogillin obsahující C-koncové prodloužení Cys 151-Gly 152.

Z jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje konjugát obsahující složku kovalentně vázanou k proteinovému analogu jak je uvedeno výše. S výhodou je konjugátem imunotoxin a zejména imunotoxin selektivní k tumorům. S výhodou má konjugát účinnost měřenou prostřednictvím in vitro stanovení cytotoxicity popsaného v sekci 9.1, jako $10E-7M$ nebo méně, ještě lépe konjugát má účinnost $10E-8M$ nebo méně a nejlépe má konjugát účinnost $10E-9M$ nebo méně.

Z jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje sekvenci polynukleotidů schopnou kodovat bílkovinný analog jak je popsáno výše. Výraz "schopný kodovat" odpovídá degeneraci genetického kodu, kde některé aminokyseliny jsou kodovány více než jedním tripletem nukleotidů či kodonem.

Z jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje replikativní klonovací vektor skládající se z polynukleotidové sekvence popsané výše jako je například plasmid.

Z jiného hlediska předkládaný vynález popisuje replikativní expresní vektor tvořený výše popsanou polynukleotidovou sekvencí jako je například plasmid.

Z jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje rekombinantní hostitelské buňky transformované, jak je výše popsáno, replikativním expresním vektorem. Hostitelské buňky mohou být buňkami prokaryotními nebo eukaryotními, jako jsou například buňky bakteriální, kvasničné nebo savčí.

Z jiného hlediska předkládaný vynález popisuje metodu pro produkci bílkovinného analogu, která zahrnuje kultivaci výše popsaných rekombinantních hostitelských buněk. Rekombinantní restriktocin exprimovaný v E.coli může být produkován buď v rozpustné formě (zvláště po úpravě expresního konstruktu a růstových podmínek), nebo v nerozpustných inkusních částicích. Expres eukaryotických polypeptidů v E.coli je známa z literatury a byla popsána Martsonem F.A.O. v Biochem.J. 1986, 240, s.1-12 a v Methods in Enzymology 185, Academic Press 1990. Purifikace bílkovin akumulujících se v rozpustné formě může být provedena po

buněčné lysy (po sonikaci nebo homogenizaci za vysokého tlaku), odstředění, ionexovou chromatografií, gelovou chromatografií, srážením pomocí síranu amonného, chromatografií využívající triazinová barviva, a to i různou kombinací těchto metod. Renaturace a purifikace nerozpustného restriktocinu může být po buněčné lysi (po sonikaci nebo homogenizaci za vysokého tlaku) a odstředění provedena promýváním frakcí pelet pufrům nebo mírným chaotropním činidlem, solubilizací v chaotropních činidlech (např. 6M guanidin.HCl, 8M močovina, detergenty bez nebo s redukujícími látkami), za níž následuje kontrolované odstranění chaotropního činidla (zředěním nebo dialýsou) a vytvořením disulfidových vazeb oxidačními reakcemi (např. s použitím rozpuštěného vzduchu, glutathionových redoxních pufrů atd.) Výsledný solubilizovaný renaturovaný restriktocin může být dále purifikován.

Alternativně může být restriktocin exprimován vhodným kvasničným systémem s vylučováním dohotovené bílkoviny do kultivačního media za použití již známých postupů (Methods in Enzymology 194, Academic Press 1991 a Methods in Yeast genetics od Rose, M. Winston, F. a Hieter, P., Cold Spring Harbour Press 1990). Expressní systém může zahrnovat sekreční sekvence z kvasinek nebo sekreční sekvence z Aspergilu, jako například restriktocinovou presekvenci k podpoře vylučování aktivní bílkoviny do media efektivním způsobem. Purifikace z kvasničných supernatantů lze dosáhnout za použití standardních metod.

Podle jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje farmaceutickou kompozici obsahující bílkovinný analog kovalentně vázaný k partnerské molekule jako aktivní složka

ve spojení s farmaceutickým excipientem nebo přenašečem. S výhodou komposice obsahuje účinné množství řečené aktivní složky.

Podle jiného hlediska předkládaný vynález poskytuje farmaceutickou komposici obsahující výšepopsaný konjugát jako aktivní složku ve spojení s farmaceutickým excipientem nebo přenašečem. S výhodou je konjugátem imunotoxin a zejména imunotoxin selektivní vůči tumorům. S výhodou komposice obsahuje účinné množství řečené aktivní složky.

Farmaceutické komposice, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mohou mít celou škálu dávkovacích forem. Obecně řečeno farmaceutické komposice, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mohou být dávkovány nitrosvalově, s výhodou nitrožilně. Zvláštní nitrosvalová farmaceutická komposice je taková, která je připravena ve formě jednotkové dávky vhodné pro injekční aplikaci. Takže zejména vhodnými komposicemi jsou roztoky, emulze či suspence imunokonjugátu nebo bílkovinného analoga vázaného ke druhé složce ve shodě s farmaceuticky přijatelným nosným médiem či ředící látkou. Vhodné přenašeče nebo ředící látky zahrnují vodná nosná media, například vodu či fyziologický roztok, a nevodná media, například fixované oleje či liposomy. Komposice může zahrnovat činidla zvyšující stabilitu. Například může komposice obsahovat pufr. Koncentrace aktivní složky se mění, ale obecně bývá aktivní složka formulována v koncentracích kolem 1 až 10 mg/kg.

Podle jiného aspektu předkládaného vynálezu je zde poskytována metoda ošetření tumoru nebo tumorů, které se skládá z potřebného ošetření člověka nebo zvířete

farmaceuticky aktivním množstvím konjugátu popsaného výše. S výhodou je tímto konjugátem imunotoxin, a zejména imunotoxin selektivní vůči tumorům.

Podle jiného aspektu předkládaného vynálezu je zde poskytován konjugát, jak je popsáno výše, určený k využití jako aktivní terapeutická substance. S výhodou je tímto konjugátem imunotoxin, a zejména imunotoxin selektivní vůči tumorům.

Podle jiného aspektu předkládaného vynálezu je zde poskytován využití bílkovinného analogu k přípravě konjugátu jakým je například imunotoxin.

Podle jiného aspektu předkládaného vynálezu je zde poskytován metoda přípravy konjugátu, kterážto metoda sestává z vazby bílkovinného analogu ke druhé složce jak je popsáno výše.

Vynález bude nyní ilustrován, ale nikoliv omezován odkazem na následující příklady.

PŘÍKLAD 1 - Struktura bílkovinného analogu.

Struktury restriktocinu, mitogillinu a alfa-sarcinu byly srovnávány, Lamy, B. a Davies, J. v Nucleic Acid Research, 1991, 19, 1001-1006. restriktocin je bílkovina o 149 aminokyselinách produkovaná organismem Aspergillus restriktus. Obsahuje 4 cysteinové zbytky o nichž se předpokládá, že vytváří dvě disulfidové vazby. Mitogillin je identický s restriktocinem s výjimkou polohy 52 kde je serin restriktocinu zaměněn asparaginem v mitogillinu. Restriktocin

a alfa-sarcin jsou z 86% homologní ve své sekvenci aminokyselin. Díky extrémně selektivnímu účinku této třídy bílkovin byla jejich struktura vysoce konservována.

Bílkovinné analogy předkládaného vynálezu zahrnují restriktocin a mitogillin v nichž je na C-konci přidáno prodloužení o Cys 150-Gly 151 a alfa-sarcin v němž je přidáno na C-konci prodloužení Cys 151-Gly 152. Bílkovinné analogy předkládaného vynálezu zahrnují restriktocin a mitogillin v nichž je Lys 13 zaměněn za cystein a alfa-sarcin v němž je Lys 14 zaměněn za cystein.

Bílkovinné analogy předkládaného vynálezu zahrnují restriktocin a mitogillin v nichž je Lys 106 zaměněn za cystein a alfa-sarcin v němž je Lys 107 zaměněn za cystein.

Bílkovinné analogy předkládaného vynálezu zahrnují restriktocin a mitogillin v nichž je Lys 110 zaměněn za cystein a alfa-sarcin, v němž je Lys 111 zaměněn za cystein.

Bílkovinné analogy předkládaného vynálezu zahrnují restriktocin a mitogillin v nichž je Ser 82 zaměněn za cystein a alfa-sarcin v němž je Ser 83 zaměněn za cystein.

Oblasti bílkovin, které jsou nevhodné pro přípravu analogů tohoto vynálezu jsou popsány níže. Smyčka tvořená zbytky 34-43 je velmi blízko aktivního místa restriktocinu a tudíž změna Lys 42 na cystein by mohla vést ke vzniku bílkoviny s podobnou aktivitou. Podobné závěry jsou platné pro odpovídající zbytky v alfa-sarcinu.

Dále změna případných katalytických zbytků His 136 a Glu 95 v restriktocinu může vést ke vzniku neaktivní bílkoviny. Náhrada cysteinovými zbytky přiléhajícími k již existujícím v molekule zbytkům cysteinu by mohla vést ke vzniku nesprávných disulfidových můstků, které opět mohou způsobit vznik neaktivní molekulární struktury. Podobné závěry jsou platné pro odpovídající zbytky v alfa-sarcinu.

Substituce zbytků, která může být důležitá k udržení celkové strukturní konformace (včetně výše popsanych míst přiléhajících k cysteinu) by mohla vést ke vzniku neaktivní bílkoviny, a to vzhledem k deformaci oblasti aktivního místa nebo větších konformačních nebo strukturálních změn, které brání vytvoření aktivní struktury. Takové zbytky v případě restriktocinu by mohly zahrnovat residua prolinu (např. Pro 97, Pro 100, Pro 112, Pro 118, Pro 126 atd.) nebo residua ve struktuře alfa helixu molekuly (zbytky 15-28). Podobné závěry jsou platné pro odpovídající zbytky v alfa-sarcinu.

Příklad 2 - Příprava genů kodujících analogy restriktocinu

Všechny metodologické postupy, není-li uvedeno jinak, představují standardní techniky používané v molekulární biologii popsané v publikaci Maniatis, T. a kol. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring harbour Press, New York.

2.1 Klonování sekvence kodující restriktocin z mikroorganismu *Aspergillus restrictus*.

Aspergillus restrictus byl získán ze sbírky American

Type Culture Collection (ATCC 34475). Spory plísňe byly použity k inokulaci media, které obsahovalo 2% w/v sojové moučky, 2% w/v kukuřičné moučky, 1% w/v kukuřičného výluhu, 0,5% uhličitan vápenatý, 1% pepton a 0,5% odpěňovače obsahujícího oktadekanol v živočišném oleji. 50 ml kultury byly kultivovány v 250 ml konických baňkách za třepání při 30°C po dobu 48 hodin.

Genomová DNA byla izolována z Aspergillus restrictus, jak je níže popsáno. Obsah devíti třepaných baněk jak uvedeno výše byl zfiltrován přes filtr s velikostí pórů 2 mikrometry. Z materiálu zadrženého na filtru byly pomocí lžičky přeneseny dávky o přibližném objemu asi 5 centimetrů krychlových do tekutého dusíku a homogenizovány (deseti pulsy o 15 sekundách) v homogenizátoru Waring při nastavení na "vysoké" otáčky. Homogenizovaný materiál byl přenesen do kádinky a zbylý tekutý dusík ponechán volně odpařit. K této směsi bylo přidáno 150 ml 0,3M octanu sodného, 15 ml 20% w/v dodecylsulfátu sodného a 15 ml směsi fenol/chloroform (přípravené podle: Maniatis a kol., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 458-459, 1982). Směs byla míchána po dobu 5 minut. Získaná emulze byla odstředěna při 20000 g po 5 minut. DNA byla srážena z vodné fáze přidávkem etanolu (450 ml) a odstředěním při 20 000g po dobu 5 minut. Pelet byl promyt 70% etanolem v/v, vysušen ve vakuu a resuspendován v TE-puftru pH8,0 (2 ml, připravený dle Maniatis a kol., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press p. 448, 1982) s obsahem ribonukleasy A (25 ul s obsahem 100 mikrogramů na ml v TE jak uvedeno výše, zahřátém na 100°C na 5 minut). Pufr TE obsahuje 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA při pH 8. Výsledný roztok byl inkubován při 37°C po 150 minut, potom

byla přidána voda (7ml) a 3,0M octan sodný (1ml). DNA byla sražena přidavkem etanolu (30 ml) a odstředěna při 12 000g jednu minutu. Pelet byl resuspendován v 0,3M octanu sodném (10 ml) a extrahován směsí fenol/chloroform (5ml, jak uvedeno výše). Výsledná emulze byla odstředěna při 12 000g po 5 minut. DNA byla sražena z vodné fáze přidavkem etanolu (30ml) a odstředěním při 12 000g po dobu 1 minuty. Pelet byl promyt 70% v/v etanolem (40ml), vysušen ve vakuu a resuspendován v pufru TE pH8,0 (řml, připravený jak uvedeno výše). Tento roztok genomové DNA Aspergillus restrictus byl skladován při -20°C.

Část DNA připravená výšepopsaným postupem, obsahující kódující sekvence pro hotový restriktocin byla zmnožena za použití řetězové polymerasové reakce (PCR), jak je popsáno v: Kleppe a kol., J. Mol. Biol., 56, 341-361, (1971), a Saiki a kol., Science, 239, 487-491, (1988). Řetězová polymerasová reakce (PCR) byla prováděna za použití termostabilní DNA polymerasy z bakterie Thermus aquaticus popsané v: Chien a kol., Biochemistry, 27, 1550-1557, (1976). Oligodeoxyribonukleotidové (dále jen jako oligonukleotidové) primery byly navrženy pro polymerasovou řetězovou reakci podle možných kódujících sekvencí DNA restriktocinu. Toto bylo učiněno s pomocí primární (sekvence aminokyselin) struktury restriktocinu, popsané Lopez-Otinem a kol., (Eur. J. Biochem. 143, p621-634). Nukleotidové sekvence oligonukleotidových primerů byly variabilní ve specifických polohách za účelem umožnění degenerace genetického kodu. Zvláštní vlastnosti byly zavedeny do sekvencí oligonukleotidových primerů, avšak tak, že ne úplně všechny kodony pro danou aminokyselinu byly přítomny. Účelem bylo maximalisovat využití kodonů pro ty kodony, které se nalézají

ve vysoce exprimovaných genech v *E. coli*. Předpokládá se, že toto je obzvláště důležité na 5 konci kodující sekvence. Další vlastností návrhu oligonukleotidového primeru (nikoliv ihned využitou) bylo zavedení schopnosti primeru generovat analogy proteinu zakodovaného v DNA sekvenci vázané oligonukleotidovými primery při použití v řetězové polymerasové reakci (PCR). Další vlastností návrhu oligonukleotidového primeru bylo zavedení rozpoznávací sekvence pro restriční enzym za účelem umožnění klonování produktů řetězové polymerasové reakce (PCR) získaných při použití polynukleotidových primerů.

Zmnožení genomové DNA *Aspergillus restrictus* pomocí řetězové polymerasové reakce (PCR) bylo uskutečněno smícháním 1 mikrolitru roztoku s oligonukleotidovým primerem SEQ.ID NO. 1, 116 pikomoly oligonukleotidového primeru SEQ.ID NO. 2 a s 1,25 jednotkami DNA polymerasy z *Thermus aquaticus* (Cetus "Amplitaq") ve 100 mikrolitrech roztoku, který také obsahoval (v konečné koncentraci) 100 mikromolů každého ze čtyř deoxynukleosidtrifosfátů, dATP, dTTP, dCTP a dGTP, 1,2mM chloridu hořečnatého, 10mM Tris/HCl pH 8,3, 50mM chloridu draselného a 0.01% w/v želatiny. Tento roztok byl převrstven lehkým minerálním olejem (Sigma) a byla s ním provedena termální cyklace. Termální cyklace se skládala z 10 cyklů při 94°C po 1 minutu, 37°C po 2 minuty a 55°C po 2 minuty, následovaných 20 cykly při 94°C po 1 minutu, 60°C po 2 minuty a 72°C po 2 minuty a z konečné inkubace při 72°C prodloužené na 5 minut. Po gelové elektroforese byl hlavní produkt izolován s použitím DEAE celulosové membrány (NA45 paper) jak je popsáno v: Maniatis a kol., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, New

York. Metoda popsaná v Maniatisovi je založena na výsledcích Dretzena a kol., (1981) Anal. Biochem. 112, 295. NA45 paper je membrána DEAE celulosy dodávaná firmou Schleicher a Schull.

Výchozím záměrem bylo klonovat produkt PCR do M13mp11 přes místa PvuII a Sal I, neboť oligonukleotidy SEQ. ID NO. 1 a 2 obsahovaly tomu odpovídající rozpoznávací sekvence. Sekvenování takových klonů M13 však ukázalo, že restriktocinový gen je zkomolený, což bylo připisováno a později potvrzeno, jako důsledek přítomnosti rozpoznávací sekvence PvuII uvnitř genové sekvence restriktocinu. Proto byla provedena druhá reakce PCR k zavedení jiných klonovacích míst do produktu PCR, 5 k restriktocinovému genu. Přibližně 1 mikrolitr eluátu byl reamplifikován, jak je uvedeno výše, se 100 pikomoly každého z oligonukleotidových primerů SEQ.ID NO. 3 a 4. Termální cyklace se skládala z 5 cyklů prováděných při 94°C po dobu 1 minuty, 37°C po 2 minuty a 55°C po dobu 2 minut, následovaných 25 cykly při 94°C po dobu 1 minuty, 60°C po dobu 2 minut a 72°C po dobu 2 minut a z konečné inkubace při 72°C prodloužené na 5 minut. Hlavní produkt byl izolován po elektroforese v agarosovém gelu pomocí membrány NA45 paper jak je popsáno výše.

Purifikovaný produkt PCR byl štěpen BamHI a SalI a ligován do M13mp11 štěpeného pomocí SalI a BamHI za použití T4 DNA ligasy. Ligační směsi byly použity k transfekci E. coli, kmen TG1. TG1 byl poskytnut s "Oligonucleotide-Directed In-Vitro Mutagenesis System Version 2" dodávaný firmou Amersham (kód RPN-1523) a byl vhodný pro postup řízené mutagenese jak je popsáno níže, avšak jiné hostitelské kmeny M13 které jsou nositeli

F-pilusu mohou být také použity, jako například JM101 (ATCC No. 33876). Kmen TG1 má publikovaný genotyp K12, delta(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F traD36, proA⁺B⁺, lacI_q, lacZ delta M15 (Gibson 1984, Ph.D. thesis, University of Cambridge, U.K.) a TG1 je volně dostupný například z E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA. restriktocinové sekvence byly kontrolovány s použitím přístupu s terminací dideoxy řetězce, jako je například použití sekvenačního kitu "Sequenase version 2" dodávaného firmou United States Biochemicals. Nejprve byly použity sekvenční primery M13 a M13 reverse (SEQ. ID NO. 5 a 6). Nejdříve byly použity primer M13 a M13 reversní sekvenační primer (SEQ. ID č. 5 a 6). Sekvence restriktocinu byla dokončena za použití sekvenačních primerů s SEQ ID NOS. 7, 8 a 9. Závěrem byla získána sekvence (SEQ. ID. NO. 10) kodující hotový "divoký" typ restriktocinu. Lemovací sekvence až ke klonovacím místům BamHI a SalI měly následující uspořádání:

Na 5 konci sekvence kodující restriktocin:

5 - GGATCCTGCA GCT ACT TGG ACT
Ala Thr Trp Thr

Na 3 konci sekvence kodující restriktocin:

.....CTG TGT AGC CAC TAA TAA TAG TCGAC-3
Leu Cys Ser His End End End

Klon M13-restriktocin byl dále štěpen restriktčními endonukleasami SalI a HindIII, aby následující subklonování bylo jednodušší. Malý (přibližně 0,6Kb) fragment SalI-HindIII pocházející z pBR322 byl dále klonován do páteře

M13-restriktocinového klonu. To mělo za následek ztrátu PstI rozpoznávacího místa přiléhajícího k místu SalI ležícího na 3 konci restriktocinového genu.

Získaná sekvence kódující restriktocin byla shodná s publikovanou aminokyselinovou sekvencí hotového restriktocinu kromě posice 115. Publikovaná aminokyselinová sekvence obsahovala asparaginový zbytek v posici 115 (Lopez-Otin a kol. (1984), 143, s.621-634), avšak naše sekvenované PCR produkty naznačovaly v pozici 115 přítomnost zbytku kyseliny aspartové (GAC). Zveřejnění genomové sekvence restriktocinu (Lamy, B. a Davies, J. (1991) *Nucleic acids Res.* 19 (5), s.1001-1006) podpořilo naši domněnku o tom, že původně publikovaná aminokyselinová sekvence byla nesprávná. Tudiž naše sekvence kódující restriktocin (sekvence ID no.10) koduje tutéž bílkovinu, která byla předpovězena z genomové sekvence pro hotový restriktocin. Mělo by být však zdůrazněno, že nukleotidová sekvence byla odlišná na 5 (a 3) koncích vzhledem k použití metody PCR pro klonování genu.

2.2. Vznik sekvencí kodujících analogy restriktocinu

Důvodem klonování sekvence kodující restriktocin do vektoru M13 byla snaha umožnit řízenou mutagenezi a tím vytvářet analogy s požadovanými vlastnostmi. Mutagenese byla prováděna za pomoci soupravy Oligonucleotide-Directed In Vitro Mutagenesis System Version 2 dodávané firmou Amersham (kod RPN-1523). Tato souprava využívá metody popsané Sayersem a kol. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16, s. 791-802). 5 fosforylovaný mutagenní oligonukleotid (viz dále) byl připojen k jednovláknovému templátu (M13 restriktocinový

plasmid popsaný výše) a rozšířen Klenowovou polymerasou v přítomnosti T4 DNA ligasy za vzniku mutantního heteroduplexu. Selektivní odstranění nezmutovaného vlákna bylo umožněno inkorporací thionukleotidu do zmutovaného vlákna během výše popsané syntézy prováděné *in vitro*. Štěpení restriční endonukleasou (NciI), která není schopná štěpit fosforothioat DNA, vede ke vzniku zlomu pouze u vlákna templátu. Zlom představuje místo pro exonukleasu III, která byla použita pro štěpení a odstranění nezmutovaného (neobsahujícího fosforothioat) vlákna sekvence restriktocinu. Zmutované vlákno bylo dále využito jako templát k rekonstrukci dvouvláknové uzavřené kruhové molekuly působením DNA polymerasy I a T4 DNA ligasy, kdy došlo k vytvoření homoduplexní molekuly. Sekvence pro analogy restriktocinu TR3 /TR4 /TR5 /TR6 /TR1, obsahující substituci Cys82 místo Ser82/ Cys 106 místo Lys 106/ Cys13 místo Lys13/ a C-koncové rozšíření Cys150-Gly151/ substituci Cys 110 místo Lys 110, vznikla za použití 5 fosforylovaných mutagenních oligonukleotidů s SEQ ID NO.13: CCGAAGCACT GCCAGAACGG C / SEQ ID NO.14: CACGACTATT GCTTTGACTC G / SEQ. ID. NO. 15: CTGAATCCCT GCACAAACAA A / SEQ.ID NO. 16: CTGTGTAGCC ACTGCGGTTA ATAATAGTCG / SEQ ID NO. 41: TTT GACTCGT GCAAACCCAA G.

Příklad 3 - Expresse restriktocinu a analogů

3.1. Vznik expresního vektoru pro restriktocin

Vytváření expresního vektoru pro restriktocin, který obsahoval promotor lambda PL bylo započato s prekursorovými plasmidy pICI0074 a pICI1079. Vektor pICI1079 byl podle Budapešťské dohody uložen ve sbírce National Collections of

Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB), 23 St. Machar Drive, v Aberdeenu, AB2 1RY, Skotsko, U.K. (NCIMB No. 4037), datum uložení 19. února 1991). (pod kódovým označením PLB 014) Produkce vektorů pICI0074 a pICI1079 jsou popsány v European Patent Publication No 459630A2 publikované 4. prosince 1991.

PICI0074 a pICI1079 byly štěpeny enzymy EcoRI a SacI. Potom byly fragmenty podrobeny ligaci a ligační reakční směs byla použita pro transformaci buněk E.coli. Restrikčním mapováním byl proveden výběr pomocí něž byl identifikován rekombinantní plasmid v němž lambdaPL/CI857 represorový fragment z pICI1079 byl insertován do páteře fragmentu pICI0074, která obsahuje tetracyklinové geny, cer stabilitní funkci, mnohačetná restrikční klonovací místa a T4 transkripční terminátor. Spojovací sekvence obsahující sekvenci místa pro vazbu ribosomu byla klonována mezi SacI a KpnI místa (tzn. do polylinkeru) výše vzniklého intermediárního vektoru. Spojka pro vznik expresního vektoru pICI 0122 (lambdaPL-RBS7) byla vytvořena hybridizací 5 fosforylovaných oligonukleotidů, SEQ. ID. NOS. 11 a 12:

CAATCTAGAG GGTATTAATA ATGTTCCCAT TGGATGA TTAAATGGTA C
TCGA GTTAGATCTC CCATAATTAT TACAAGGGTA ACCTCCTACT AATTTAC

Restriktocin kodující sekvence SEQ. ID. No. 10 a analogy restriktocinu popsané výše byly subklonovány z restriktocinových klonů M13 do lambdaPL-RBS7 pomocí subklonovací strategie nyní popsané v detailu tak, aby byly vytvořeny expresní vektory pro restriktocin. Vektor kodující divoký typ restriktocinu byl nazván pICI 1453 (lambdaPL-RBS7-RES), vektor kodující analogy se substitucí Cys82 místo Ser82 byl nazván pICI 1485, vektor kodující

analogy se substitucí Cys106 místo Lys106 byl nazván pICI 1486, vektor kodující analogy se substitucí Cys13 místo Lys13 byl nazván pICI 1487, vektor kodující C-koncové prodloužení Cys150-Gly151 nazván pICI 1488 a vektor kodující analogy se substitucí Cys110 místo Lys110 byl nazván pICI 1472.

Nejprve byl pICI 0122 štěpen pomocí KpnI a na převisu byl vytvořen tupý konec prostřednictvím T4 DNA polymerasy. Potom byl dále štěpen pomocí XhoI (podobně jako KpnI, umístěný v polylinkeru), ještě před působením alkalické fosfatasy z telecího střeva, aby se zabránilo zpětné ligaci fragmentů. Restriktocinové klony M13 obsahující buď divoký typ restriktocinu nebo restriktocinové analogy byly štěpeny pomocí PstI a potom byly na převisech vytvořeny tupé konce pomocí T4 DNA polymerasy. Štěpení pomocí SalI uvolnilo sekvenci kodující restriktocin. Poté byla provedena ligační reakce pro inserci restriktocinového fragmentu do páteře pICI 0122. Na 5 konci restriktocinové sekvence je ligace s tupým koncem, avšak převis po SalI na 3 konci je kompatibilní s oblastí XhoI. Reakce mezi PstI/tupé zakončením poskytuje na 5 konci většinu basí restriktocinového fragmentu jako prvou basi prvního kodonu sekvence kodující restriktocin. Reakce mezi KpnI/tupé zakončení poskytuje na 3 konci páteře expresního vektoru triplet ATG, což byl iniciační kodon odpovídající sekvenci RBS přímo proti směru exprese. Tímto ligace poskytly spojení sekvencí kodujících restriktocin ve čtecím rámci s translačním iniciačním kodonem.

3.2 Studium exprese.

Nejprve, po charakterisaci, byl pICI1453

(lambdaPL-RBS7-RES) transformován do E. coli MSD 462. 75 ml media M9 doplněného 0,02% kyselého hydrolyzátu kaseinu (Oxoid L41) a 15ug/ml tetracyklinu bylo inokulováno jednotlivou kolonií z čerstvé misky a kultivováno přes noc při jemném třepání. Medium M9 obsahuje 6g/l hydrogenorthofosforečnanu dvojsodného, 3g/l dihydrogenorthofosforečnanu draselného, 0,5g/l chloridu sodného, 1,0g/l chloridu amonného, 1mM síranu hořečnatého, 0,1mM chloridu vápenatého, 2g/l glukosy a 4ug/ml thiaminu. Bylo měřeno OD₅₅₀ a kultura zředěna tímtež médiem na výsledný objem 75 ml o OD₅₅₀=0,1. Tato kultura byla pěstována při 37°C při jemném třepání dokud OD₅₅₀=0,4-0,6 (přibližně 3-4 hodiny). Teplota inkubátoru byla poté zvýšena na 42°C a růst pokračoval další 3 hodiny, aby došlo k indukci exprese restriktocinu. SDS-PAGE gely lysátu celých buněk však nevykázaly žádnou expresi restriktocinu. Následně byla použita metoda "pulse chase labeling" s využitím 35-S methioninu k průkazu toho, že akumulaci restriktocinu drasticky omezuje jeho krátký poločas. Tento problém nestability můžeme překonat použitím kmene MSD460 s deficiencí proteasy. Růst a indukční protokol jsou stejné jako u MSD462, s tím rozdílem, že medium M9 je dále doplněno 45mg/l methioninu. MSD460(pICI1453) poskytuje akumulaci restriktocinu na úrovni 5-10% celkové buněčné bílkoviny a podobné akumulace analogů restriktocinu jsou získány s expresními vektory analogů restriktocinu pICI 1485, pICI 1486, pICI 1487, pICI 1488 a pICI 1472.

Mohou být použity jiné promotorové systémy založené na standardních postupech.

3.4. Odvození MSD460 (hostitelský kmen pro expresi restriktocinu).

Allela lon byla zavedena do MSD 101 (E. coli W3110) pomocí transdukce P1 z SG20252 (Trislar a Gottesman (1984) J. Bacteriol. 160, 184-191) a selekce na tetracyklinovou resistenci, následované výběrem podle citlivosti k nitrofurantoinu. SG20252 měl transposon Tn10 s tetracyklinovou resistencí těsně spjatý s allelou lon100. Citlivost k nitrofurantoinu byla charakteristická pro lon-kmeny. Jeden z výsledných klonů byl označen MSD310. Přítomnost transposonu v tomto kmeni byla nežádoucí a derivát postrádající tento element byl izolován vyhledáváním spontánně se objevujících klonů které ztratily resistenci vůči tetracyklinu. Jeden z nich, označený MSD413 byl izolován a bylo prokázáno že si podržel citlivost k nitrofurantoinu. Tento kmen byl mukoidní, charakteristicky pro kmeny Lon⁻. K eliminaci tohoto fenotypu, způsobenému nadprodukcí kapsulárních polysacharidů fágu Mu byla použita mutagenese vycházející z derivátu fágu Mu označeného Mu cts dl Apr lac. Následně po infekci MSD413 fágem Mu cts dlApr lac byly selektovány klony resistantní vůči ampicilinu na miskách L-amp a byly vyhledávány nemukoidní fenotypy. Jeden takový klon označený MSD413*2 byl izolován a bylo ověřeno, že si podržel citlivost vůči nitrofurantoinu. Mutace v tomto kmeni, která potlačuje nadprodukcí kapsulárního polysacharidu, byla nazvána som-6. Přítomnost Mu cts dl Apr lac v tomto kmeni není žádoucí. Derivát, který ztratil defektní fág, ale podržel si som-6, byl izolován konvenčním tepelným ošetřením a výběrem na ztrátu resistance vůči ampicilinu. Jeden takový klon, u kterého bylo prokázáno zachování som-6, a který byl citlivý k nitrofurantoinu, byl označen MSD460.

Při rozsáhlejší charakterisaci bylo shledáno, že MSD460 vyžaduje k růstu methionin, avšak nikoliv histidin (čili je Met⁻) a není schopen růstu, pokud je jediným zdrojem uhlíku arabinosa, avšak zachoval si schopnost růstu na glycerolu. Nejpravděpodobnější vysvětlení těchto údajů je, že MSD460 je nositelem delece sahající přes metG a araFG v "minute 45" genetické mapy E. coli, která však nezasahuje přes operon his v "minute 44" a přes operon glp v "minute 48,5".

MSD460 byl deponován podle Budapeštské dohody u National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom. Je dostupný pod accession number NCIMB 40469 a datum uložení je 9. ledna 1992.

PŘÍKLAD 4 - Tvorba a exprese analogů alfa-sarcinu.

4.1 Tvorba syntetického genu kodujícího alfa-sarcin.

Konstrukce syntetického genu pro alfa-sarcin a jeho exprese v E. coli již byla popsána (Henze a kol., (1990) Eur. J. Biochem., 192, p127-131). Avšak po úspěšné intracelulární expresi restriktocinu se nejeví jako nutné sledovat publikovanou strategii používající sekreční vektory k překonání potenciálních problémů s toxicitou.

Syntetický gen pro alfa-sarcin (kodující sekvence) je konstruován stejným způsobem jako ten popsáný v Henzeho publikaci, s tím rozdílem, že oligonukleotidové páry použité ke konstrukci 5 a 3 konců genu jsou rozdílné a pár bazí v jednom z vnitřních oligonukleotidových párů je odlišný. Další

návod stran synthesy syntetických genů je dostupný v :
Edwards, M. (1987) International Biotechnology Lab 5(3),
19-25.

Oligonukleotidové páry použité ke konstrukci 5 konce genu jsou označeny SEQ ID No. 26 a 27 (nahrazují oligonukleotidy 1 a 2 v publikaci). Tento oligonukleotidový pár dává vzniknout převisu PstI za kodující sekvencí.

Oligonukleotidové páry použité ke konstrukci 3 konce genu jsou označeny SEQ ID No. 28 a 29 (nahrazují oligonukleotidy 18 a 19 v publikaci). Tento oligonukleotidový pár dává vzniknout převisu Bam HI a zavádí štěpící místo pro SalI uvnitř tohoto převisu po směru exprese genu od stop kodonu alfa-sarcinu.

Oligonukleotidy označené v publikaci jako číslo 6 a 7 jsou nahrazeny SEQ ID No. 37 a 38. Toto odstraňuje štěpící místo BamHI, avšak nemění sekvenci kodující aminokyseliny.

Sestavený gen je poté klonován do PstI a BamHI míst M13mp10 prostřednictvím výše zmíněných převisů PstI a BamHI.

4.2 Příprava sekvence kodující analog alfa-sarcinu.

Analogy alfa-sarcinu jsou připravovány za použití stejné usměrněné mutagenese na M13 jak je popsáno v případě restriktocinu. Analogy zde popsané a mutantní oligonukleotidy fosforylované v poloze 5, použité k jejich přípravě jsou označeny následujícím způsobem:

Lys 14 na Cys 14: seq ID no. 35

Ser 82 na Cys 82: seq ID no. 31

Lys 107 na Cys 107: seq ID no. 34

C-koncové prodloužení o Cys 151 -Gly 152: seq ID no. 36

Lys 111 na Cys 111: seq ID no. 42

4.3 Konstrukce expresního vektoru alfa-sarcinu a exprese

Následně po mutagenese a charakterisaci je alfa-sarcinový analog klonován do expresního vektoru, pICI0122 (LambdaPL-RBS7) jak je popsáno pro restriktocin a jeho analogy. V souhrnu, klon M13 - alfa-sarcinový analog je štěpen pomocí PstI, tupé konce jsou vytvořeny pomocí T4 DNA polymerasy, a potom je štěpen SalI. pICI0122 je štěpen pomocí KpnI, tupé konce jsou vytvořeny pomocí T4 DNA polymerasy, a potom je štěpen XhoI. Poté je provedena ligační reakce na zavedení sekvence kodující alfa-sarcin do otevřeného vektorového polylinkeru. Výsledkem tohoto je, že ATG iniciační kodon ve vektoru je připojen tupým koncem a má shodný čtecí rámec jako první kodon alfa-sarcinu.

Expresní vektor alfa-sarcinu je potom zaveden do kmene MSD460, deficientního na proteasu, a je provedena indukce exprese, jak je popsáno výše, pro restriktocin a analogy.

PŘÍKLAD 5 - Růst *E. coli* ve fermentorech a exprese restriktocinu a analogů restriktocinu

Kmen *E. coli* MSD460 byl transformován plasmidem pICI 1453 a výsledný rekombinant byl purifikován a uchováván v glycerolu při -80°C . Byl odebrán alikvotní díl kultury a rozčárkován na agarové misky s L-tetracyklinem aby byly odděleny jednotlivé kolonie po kultivaci přes noc při 37°C . Jednotlivá kolonie MSD460 pICI1453 byla odebrána a resuspendována v 10 ml L-tetracyklinové půdy a 100 μl bylo neprodleně inokulováno do každé z deseti 250 ml Erlenmeyerových baněk s obsahem 75 ml tetracyklinové půdy. Po šestnáctihodinové kultivaci při 37°C na reciproké třepačce byl obsah baněk shromážděn a použit na inokulaci fermentoru s obsahem media popsaného níže.

Fermentace probíhala při teplotě 37°C a pH bylo automatickými přídávky roztoku 6M hydroxidu sodného udržováno na hodnotě 6,7. Hodnota parciálního tlaku rozpuštěného kyslíku (dOT) byla nastavena na úroveň 50% saturace vzduchem a byla automaticky regulována nastavením rychlosti míchání. Průtok vzduchu, který byl zpočátku 20 l/min (odpovídající 1 VVM) byl zvýšen na hodnotu 2,5 VVM, když rychlost otáčení míchadla dosáhla přibližně 80-90% svého maxima. 4,5 hodiny po provedení inokulace bylo do fermentoru započato dávkování roztoku kvasničného extraktu rychlostí 1,7g/l/h 4,5 hodiny po inokulaci, a to až do chvíle, kdy OD_{550} kultury dosáhla hodnoty 50. Pak byla rychlost zvýšena na hodnotu 3,4g/l/h.

Mezi 7-8 hodinou po provedení inokulace, v době kdy zásoba zdroje uhlíku (glycerolu) během fermentace byla vyčerpána a vedla k rychlému vzrůstu dOT z hodnoty 50%

vzdušné saturace, byl do fermentoru přítokován glycerol (714g/l) a síran amonný (143g/l) rychlostí, která snižovala rychlost spotřeby kyslíku bakteriemi na hodnotu přibližně 80% maximální rychlosti přestupu kyslíku (OTR) ve fermentoru (za výše popsaných podmínek). Kultura byla indukována zvýšením teploty z 37°C na 42°C, kdy $OD_{550}=80$. Fermentace probíhala při teplotě 42°C po dobu 5 hodin. Bakterie byly získány po odstředění v 1l centrifugačních kyvetách v odstředivce Sorvall RC-3B (7000 x g, 4°C, 30 min.) a buněčná pasta byla zmrazena při -80°C.

Podstatně tentýž protokol byl použit při růstu E.coli exprimující analogy restriktocinu.

Růstové medium

	g/l (deionizované vody)
dihydrogenorthofosforečnan draselný	3,0
hydrogenorthofosforečnan dvojsodný	6,0
chlorid sodný	0,5
hydrolyzát kaseinu (Oxoid L.41)	2,0
síran amonný	10,0
glycerol	35,0
kvasničný extrakt (Difco)	20,0
hepta-hydrát síranu hořečnatého	0,5
di-hydrát chloridu vápenatého	0,03
thiamin	0,008
hepta-hydrát síranu železnatého/kys.	
citronová	0,04/0,02
roztok stopových prvků (TES)	(0,5ml/l)
tetracyklin	(10mg/l)

Složení roztoku stopových prvků (TES)

	mg/10ml (deioniz.vody)
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
H_3BO_3	0,1
KI	2,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,09
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4

Příklad 6: Čištění bílkovinných analogů

Odstředěná biomasa *E.coli*, ve formě pasty, byla za použití homogenizátoru (Polytron) resuspendována v pufru pro lyzi buněk (1 g vlhkých biomasy v 10 ml pufru). Pufr se skládá z 50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethan hydrochloridu, 2 mM ethylen di- aminotetraoctové kyseliny (EDTA), 0,02% azidu sodného, pH 8,2. Resuspendované buňky byly potom lyzovány při 4°C vysokotlakou homogenizací (4 x opakovaně přes Manton Galin homogenizátor) nebo sonikací (5 x 45 vteřin) a získaná suspenze lyzovaných buněk byla odstředěna při 25 000 g po dobu 20 minut.

pH supernatantu, který obsahoval rozpustný toxin, bylo upraveno přidavkem naředěné kyseliny chlorovodíkové a potom

byl supernatant nanesen na kolonu s ionexovou náplní na bázi karboxymethylu (jako je karboxymethyl Sepharosa s rychlým průtokem firmy Pharmacia), předem ekvilibrovanou 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0,02% azidem sodným, pH 7. Kolona byla promyta lineárním gradientem roztokem chloridu sodného ve stejném pufru, který byl používán pro ekvilibraci kolony v rozmezí koncentrací 0 - 1 M. Přítomnost toxinu v eluátu byla zjištěna SDS-PAGE elektroforezou jednotlivých frakcí a frakce obsahující toxin byly spojeny.

Sebrané frakce obsahující toxin byly dialyzovány nebo diafiltrány proti 25 mM fosforečnanu sodnému pH 7,5. Vzorky s toxinem, které se vysrážely po dialýze, byly odstředěny při 40 000 g po dobu 20 minut a supernatanty byly spojeny. Roztok toxinu byl nanesen na kolonu s afinitní barvičkou (jako je zeleň A6XL z ACL, Cambridge, U.K.), předem ekvilibrovanou 25 mM fosforečnanem sodným pH 7,5, a procházející roztok byl sbírán.

Kolona byla promyta 25 mM fosforečnanem sodným pH 7,5 a promývací roztok byl sbírán. Kontaminující bílkoviny se vážou adsorpcí na barevný ligand, převážná část toxinu zůstala nenavázaná a byla eluována průtokem a vymyta. Přítomnost toxinu v eluátu byla stanovena SDS-PAGE elektroforezou a frakce obsahující toxin byly spojeny.

Spojené frakce obsahovaly více než 95% toxinu (stanoveno SDS-PAGE elektroforezou). Malé množství disulfidickými můstky vázaných iméru toxinu o molekulové váze 34 kDa bylo pozorováno v některých purifikovaných analozích (TR1 5%, TR4 < 5%, TR5 < 5, TR6 20%). Identita Proužků o molekulové váze 34 kDa byla potvrzena SDS-PAGE elektroblotíngem

a sekvenováním z N-konce (Problott, Applied Biosystems, USA) (Matsuidara, J.Biol.Chem 262 : 10035-38).

Čistota alikvotů spojených frakcí purifikovaného toxinu byla potvrzena SDS-PAGE elektroforezou a elektroblottingem. Proužky o molekulové váze 17 kDa byly vyříznuty a podrobeny sekvenační analýze N-konce na Applied Biosystem 475 sekvenátoru bílkovin (Applied Biosystems, USA). TR1, TR3 a TR4 vykazovaly N-terminální sekvence restriktocinu bez žádných dalších detegovatelných sekvencí. TR5 a TR6 vykazovaly N-terminální sekvence restriktocinu spolu s dalšími neidentifikovanými bílkovinami. U těchto bílkovin neuspělo využití průzkumu Genembl, Swissprot a NBRF databáze sekvencí při hledání jakékoliv signifikantní homologie se známými bílkovinami. Tato kontaminující bílkovina reprezentovala 10% a 15% celkových bílkovin pro TR5 a TR6, což bylo stanoveno srovnáním plochy píků po HPLC na reverzní fázi (monitorováno při 214 nm). Totožnost píků byla potvrzena sekvenováním N-konců.

6.1 Podrobný popis čištění analogu TR4

200 g vlhké buněčné biomasy analogu T4 E.coli bylo resuspendováno ve 2 l lysovacího pufru (1 g na 10 ml) a po té bylo lysováno sonikací jak bylo popsáno v bodu 6. Po odstředění bylo získáno 1,8 l supernatantu, u kterého bylo upraveno pH na hodnotu 7, jak bylo popsáno v bodě 6. Tento supernatant byl nanesen na kolonu naplněnou karboxymethyl Sepharosou s rychlým průtokem (Pharmacia), [objem náplně 290 ml, rozměry 5 cm x 15 cm) s rychlostí průtoku 8 ml za minutu. Po promytí kolony ekvilibračním pufrem do ustáleného stavu, kdy hodnoty absorbance měřené při 280 nm byly na

základní čáře, byl toxin z kolony eluován pomocí lineárního gradientu chloridu sodného v rozmezí koncentrací 0 - 1 M, v celkovém objemu 500 ml, při průtoku 8 ml za minutu. Frakce obsahující toxin byly stanoveny SDS-PAGE analýzou alikvotů frakcí.

Frakce obsahující toxin byly spojeny (celkový objem 90 ml) a dialyzovány (Spectrapor, membrána zachycující bílkoviny s molekulovou hmotností 3,5 kDa, Pierce, USA) proti 5 l pufru jak bylo popsáno v bodu 6. Roztok dialyzovaného toxinu byl nanesen na afinitní kolonu "mimetic" zelení A6XL (ACL, Cambridge, U.K.) [objem náplně 150 ml, rozměry 2,6 cm x 28 cm] s rychlostí průtoku 4,25 ml za minutu a proteklé frakce a promyvy byly hromaděny jak bylo popsáno v bodě 6. Frakce obsahující toxin byly určeny SDS-PAGE analýzou a spojeny.

Vzorky spojeného čištěného toxinu byly analyzovány SDS-PAGE, SDS-PAGE alektroblottingem a sekvenováním N-konce, analýzou aminokyselin a biologická aktivita byla stanovena pomocí testu na stanovení inhibice syntézy bílkovin, jak je popsáno v bodě 8.

Čistota toxinu byla více než 95% (stanoveno SDS-PAGE), s < 5% diméry s disulfidickou vazbou a 17 kDa proužky (stanoveno SDS-PAGE), kde byla stanovena pouze N-koncová sekvence restriktocinu. 7,2 mg toxinu bylo podroběno analýze složení aminokyselin. Specifická biologická aktivita toxinu je ukázána v bodě 8,3.

Koncentrace výsledných přečištěných analogů restriktocinu byla stanovena analýzou aminokyselin. Před vazbou na protilátku byly přečištěné analogy zakoncentrovány

membránovou filtrací.

Vzorky přečištěných analogů byla testovány na inhibicici syntézy bílkovin jak je dokumentováno dále v bodě 8.

Analogy toxinů TR1, TR3, TR5 a TR6 byly čištěny a analyzovány za použití postupu popsaného pro TR4.

6.2 Čištění rekombinantního restriktocinu

Rekombinantní restriktocin byl čištěn jak je popsáno pro analog T4 kromě toho, že pH supernatantu po lyzy bylo upraveno na 8 před nanesením na kolonu s karboxymethyl Sepharosou s rychlým průtokem, kolona byla ekvilibrována a promyta pufrem pH 8 a toxin byl eluován lineárním gradientem chloridem sodným ve stejném pufru, v koncentračním rozmezí 0 - 0,5 M. Také byl použit další purifikační krok, po afinitní chromatografii s barvičkou, kdy spojené frakce obsahující toxin byly zakoncentrovány ultrafiltrací (Amicon, míchaná nádobka, YM2 membrána) a chromatografovány na vylučovací koloně Sephacrylu S-200 HR. kolona byla předem ekvilibrována 20 mM fosforečnanem sodným, 150 mM chloridem sodným, pH 7,5 a vzorky byly eluovány stejným pufrem. Přítomnost toxinu v eluátech byla stanovena SDS-PAGE analýzou jednotlivých chromatografických frakcí.

Přečištěný vyeluovaný restriktocin s molekulovou hmotností 17 kDa, vykazoval > 98% čistotu po SDS-PAGE a SDS-PAGE přenesených zon dávala N-koncovou sekvenci restriktocinu bez dalších detegovatelných sekvencí.

Příklad 7 Vazba toxinových analogů na protilátku

Monoklonální protilátka, jako je např. 19.9 protilátka získaná z hybridomu 1116NS-19 (ATCC No.HB 8059), v PBS v koncentraci 12 mg/ml, byla naředěna 0,5 objemem borátového pufru (100 mM boritanu sodného, pH 9,1). Koncentrace bílkovin byla stanovena měřením absorbance při 280 nm a pH směsného roztoku bylo (pH = 8,7 až 8,9, s preferencí pH 8,8).

Linker (N-sukcinimidyl 3-(2-pyridyldithio) butyrát) byl rozpuštěn v suchém, redestilovaném dimethylformamidu nebo acetonitrilu v koncentraci 10 mg/ml a ihned přidán k roztoku protilátky za míchání v poměru 8 molů linkeru na mol protilátky. Vzniklý roztok byl inkubován při 20°C po dobu 1 hodiny a potom nanesen na vylučovací odsolovací kolonu ekvilibrovanou 50 mM fosforečnanem sodným/ 150 mM chloridem sodným/ 1 mM EDTA pH 8,0 na odstranění přebytečných reakčních činidel a pufr vyměnil derivatizovanou protilátku. Odsolená derivatizovaná protilátka byla jímána a koncentrace bílkovin byla stanovena měřením absorbance při 280 nm. Míra vazby linkeru byla stanovena přidavkem přebytku dithithreitolu ke vzorku derivatizované protilátky a měřením uvolněných thiopyridylových skupin spektroskopicky při 343 nm. Míra vazby linkeru byla v rozmezí od 3 do 6 molů (přednostně okolo 4 molů) skupin linkeru na jeden mol protilátky.

Rekombinantní analog toxinu byl navázán na derivatizovanou protilátku mícháním roztoku rekombinantního analogu toxinu (v PBS s pH upraveným hydroxidem sodným na pH 8,0) a roztoku derivatizované protilátky ve váhovém poměru obou složek 1:1. Nádobka byla očištěna argonem a inkubována

při 15°C po dobu 40 hodin.

Roztok bílkovin byl naředěn stejným objemem PBS o pH 8,0 (upraveno hydroxidem sodným) a po té byl k němu přidán cystein do konečné koncentrace dostačující k překrytí přebytku skupin linkeru na protilátce, aniž by přitom došlo k redukci disulfidických vazeb vázajících toxin na derivatizovanou protilátku. Uskutečnění cysteinové reakce bylo ověřeno ošetřením vzorku překrytého imunokonjugátu přebytkem dithiothreitolu a měřením absorbance spektrofotometricky při 343 nm. Nebylo detegováno žádné uvolňování thiopyridylových skupin.

Roztok imunokonjugátu byl zakoncentrován membránovou filtrací a nanesen na vylučovací chromatografickou kolonu ekvilibrovanou 50 mM fosforečnanem sodným/25 mM chloridem sodným/1mM EDTA, pH 6,3 a s frakcionačním rozmezím 10 - 200 kd. Pík bílkovin obsahující imunokonjugát byl jímán a koncentrace bílkovin stanovena měřením absorbance při 280 nm.

Příklad 8 Biologické stanovení analogů ribotoxinu

Úkolem bylo stanovit podmínky, za kterých by mohla být testována biologická aktivita vzorků v bezbuněčném in vitro stanovení inhibice syntézy bílkovin.

Lyzáty králíčích retikulocytů byly připraveny podle metody Allena a Schweeta (J.Biol.Chem (1962), 237, 760-767). Při stanovení je inhibice syntézy bílkovin demonstrována

nedostatečnou inkorporací ^{14}C značeného leucinu do nově se syntetizující bílkoviny.

8.1 Popis stanovení

Základní roztok : 1 mM směs aminokyselin bez leucinu.
Roztok obsahující všechny aminokyseliny v koncentraci 1 mM kromě leucinu (pH upraveno na pH 7,4 pomocí NaOH a roztok uchováván při -70°C).

Roztok A

40 mM octan hořečnatý

2 M octan amonný

0,2 M Tris

(pH 7,4, upraveno HCl, uchováván při 4°C)

Roztok B

ATP (adenosintrifosfát) (Sigma A5394) 246 mg/ml

GTP (guanosintrifosfát) (Sigma G8752) 24,4 mg/ml

Směs pro stanovení: 1 ml směsi aminokyselin

1 ml Roztoku A

0,1 ml Roztoku B

103 mg kreatin fosfátu

1 mg kreatinkinasy

510 ul vody

600 ul (60uCi) L-¹⁴C leucin (New England Nuclear, NEC-279E)

Reakční směs : Vzorek 25 ul

Směs pro stanovení 12,5 ul

Lyzát králičích retikulocytů 25 ul

Slepý pokus je 2 mg/ml serum hovězího albumunu (BSA) ve fosfátovém pufru s fyziologickým roztokem.

Všechny stanovení byly prováděny paralelně.

12 ul směsi pro stanovení bylo přeneseno do sterilních skleněných zkumavek

25 ul BSA v PBS bylo přidáno do každé první zkumavky ze čtyř (slepý pokus)

25 ul testovaných vzorků bylo přidáno do ostatních zbylých zkumavek

1 ml 0,1 M hydroxidu draselného bylo přidáno do prvních dvou zkumavek (pozadí slepého pokusu)

Zkumavky byly vytemperovány na 28°C ve vodní lázni

25 ul lyzátu králičích retikulocytů (ponechaných tání z teploty tekutého dusíku) bylo přidáno do každé zkumavky ve 20 vteřinových intervalech. Když se první zkumavka inkubovala 12 minut, 1 ml 0,1 M KOH byl přidán do každé zkumavky znova ve 20 vteřinových intervalech, tak aby všechny zkumavky byly

inkubovány 12 minut. Dvě kapky 20% peroxidu vodíku bylo přidán do každé zkumavky následované přidavkem 1 ml 20% trichloroctové kyseliny (TCA).

Zkumavky byly promíchány a ponechány v klidu alespoň hodinu nebo přes noc při 4°C. Sraženina byla zfiltrována na 2,5 cm kruhovém disku ze skleněných vláken, promyta 3 x 4 ml 5% TCA, přenesena do scintilačních ampulek a bylo k ní přidáno 10 ml scintilačního roztoku (Ready-Solv.MP, Beckman). Po 1 hodině byly ampulky protřepány a proměřena radioaktivita.

8.2 Techniky pro použití lyzátů E.coli

10 ml kultury v L-mediu se kultivuje přes noc při 37°C. 400 ul alikvoty se odstřeďují při 13000 rpm po dobu 30 vteřin a většina supernatantu se dekantuje.

Pelety jsou podrobeny dvěma za sebou následujícím rychlým zmrazením ve směsi tuhého kysličníku uhličitého a ethanolu následované rozmrazováním při 37°C. Po té se přidá 12 ul 25% sacharozy v 50 mM Tris HCl pH 8,0 a dále 4 ul roztoku lysosymu (10mg/ml).

Po inkubaci v ledu 15 minut, se přidá 8 ul 0,25 M EDTA a inkubace pokračuje dalších 15 minut. Lyze je způsobena osmoticky ředěním vzorků na 400 ul vodou. Tento postup dává 80-100 životných buněk na ml.

Když 25 ul alikvotu tohoto lyzátu je přidáno do směsi pro stanovení, hladina inkorporace ^{14}C -leucinu do nově syntetizované bílkoviny je přibližně 10% slepého pokusu bez lyzátu. Výsledek jasně ukazuje, že minimálně 16 -ti násobné

ředění je nutné k redukci vlivu lyzátu ve srovnání s blankem.

Aby se dalo důvěryhodně prohlásit, že lyse *E.coli* a lysáty *E.coli* nevyrovnávají toxicitu ribotoxinu, byly provedeny dvě kontrolní stanovení. V prvním byl ribotoxin přidán k 16 X ředěným buněčným peletám *E.coli*, tak aby dal ve sněsi pro stanovení, po lyzi buněk, koncentraci 8 ng/ml. Obě tyto kontroly ukazovaly zhoubný vliv lyzátu nebo postupu lyze na inhibiční působení ribotoxinu.

Tyto techniky byly použity pro ověření syntézy biologicky aktivních bílkovinných analogů.

8.3 Bioaktivita purifikovaných analogů restriktocinu

Analog	průměr IC ₅₀ (M x 10E-11)	
TR1	41,1	s.d. 14,3 (n=6)
TR3	10,5	s.d. 4,7 (n=7)
TR4	10,8	s.d. 4,5 (n=6)
TR5	13,4	s.d. 6,2 (n=6)
TR6	4,95	s.d. 0,68 (n=4)
Rekombinantí	2,27	s.d. 1,04 (n=6)

Restriktocin

Každá hodnota IC50 byla spočítána ze serie 5 ředění ribotoxinu, trojmo provedených, kdy spočítaná hodnota IC50 byla vyšší než alespoň hodnota jednoho ředění a také nižší než alespoň hodnota jednoho ředění. To říká, že hodnota IC50 byla počítána ze serie 5 ředění bez užití extrapolace.

Hodnoty pro specifickou aktivitu analogů TR5 a TR6 byly korigovány pro 10 a 15% kontaminujících bílkovin v purifikovaném produktu s ohledem na to, že kontaminující bílkovina nemá žádnou aktivitu při stanovení syntézy bílkovin. Ostatní testované analogy nevykazovaly žádnou významnou kontaminaci. Analogy restriktocinu TR5 a TR6 byly odděleny od kontaminantů použitím HPLC na reverzní fázi a proměřováním eluátu při 214 nm. Vznikající píky byly identifikovány sekvenováním N-konce. Procento kontaminace bylo spočítáno měřením ploch jednotlivých píků.

Tak analogy TR1, TR3, TR4, TR5 a TR6 obsahovaly 6%, 22%, 21%, 17%, a 46% aktivitu přírodního rekombinantního restriktocinu. Avšak tento test neukazuje nezvratnou prospěšnost analogů bílkovin, poněvadž in vitro stanovení cytotoxicity, dokumentováno dále, využívá pro stanovení prospěšnosti, konjugátu imunotoxinu. Např. potence analoga TR1, ve vztahu k rekombinantnímu restriktocinu, je signifikantně zlepšeno v in vitro testu cytotoxicity.

Příklad 9 Cytotoxicita imunotoxinu

9,1 In vitro cytotoxicita

Tento test ukazuje in vitro cytotoxicitu imunotoxinu proti lidským buňkám nádoru tlustého střeva a konečníku (Colo 205-ATCC No.CCL 222), kdy ribotoxin je navázán na protilátku, která rozpozná vnitřní antigeny buněčné linie.

Colo 205 buňky rostou v suspenzi v RPMI1640 mediu s 2,0 g/l bikarbonátu sodného, bez glutaminu, s 5% tepelně inaktivovaného zárodečného telecího séra, 2 mM L-glutaminu 50 ug/ml gentamicinu. Buňky se vystaví účinku trypsinu po dobu 15 hodin a poté se odstředí a promyjí za účelem jeho odstranění. Buňky se počítají v komůrkách hemocytometru.

Pro stanovení inhibice bílkovin se buňky nanášejí na destičku s 96 jamkami v koncentraci $2-5 \times 10^4$ buněk/jamku v objemu 100 ul. Vzorky imunotoxinu se přidají do 4 replikačních jamek. Imunotoxin se přidá ve 12 dvojnásobných ředěních od 2 000 do 0,98 ng/ml. 100 ul kultivačního media se přidá do některých jamek jako kontrola. Dříve než se přidá do každé jamky 2 uCi ^3H -L-leucinu, je každá destička inkubována 24 hodin při 37°C. Destičky jsou inkubovány při 37°C dalších 24 hodin. 50 ul trypsinu se přidá do každé jamky a destičky se inkubují po dobu dalších 15-20 minut. Buňky se přenesou z každé jamky destičky na tkaninu ze skleněných vláken a radioaktivita se stanoví beta scintilátorem takovým jaký vyrábí LKB. Křivky inhibice syntézy bílkovin se vynesou a hodnoty IC_{50} jsou odvozeny (viz níže).

průměr IC50 (M x 10E-11)

	analog-19.9 Ab imunokonjugát	analog samotný
TR1	206	58300
TR3	55,1	23300
TR4	77,5	49800
TR5	85,9	29700
TR6	20,2	21700
kontrola		
19.9 Ab samotný	více než než 100 000	

Tak analogy TR1, TR3, TR4, TR5 a TR6 jsou využitelné na přípravu potentních imunotoxinů.

9.2 In vivo cytotoxicita

Tento test ukazuje in vivo cytotoxicitu imunotoxinu proti lidským nádorovým buňkám, COLO 205, rostoucích umělý podkožní rouh u myši bez brzlíku. Současně se sleduje kontrolní skupina, využívající protilátku samotnou nebo fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku.

5×10^6 COLO 205 buněk se injektuje do jednoho podkožního místa ve slabínách myši bez brzlíku. U rostoucích nádorů se proměřují kaliperem každé 3-4 dny dva rozměry. Testované látky se neinjektují dříve než nádor dosáhne rozměr $0,7-1,0 \text{ cm}^2$. Tento moment se označí jako den 0 a testované látky se injektují intravenosně do ocasní žíly ve dnech 0,1 a 2. Velikost nádorů se dále proměřuje ve dvou rozměrech a výsledky se prezentují jako relativní objem nádoru. Měření se provádí každé 3-4 dny až do ukončení pokusu.

Tento test srovnává vliv fosfátového pufru ve fyziologickém roztoku, protilátky samotné (1,2 mg/kg) a imunotoxinu (příprava popsána výše) (2,0 mg/kg) na růst nádoru.

Imunotoxin může zvýšit zmenšování velikosti nádoru ve srovnání s fosfátovým pufrem ve fyziologickém roztoku (PBS) a protilátkou samotnou.

Příklad 10 Složení

Dále je uvedena reprezentativní farmaceutická forma obsahující imunokonjugát (imunotoxin) předkládané přihlášky vynálezu, která může být použita pro terapeutické účely u lidí.

Injektovaný roztok

Sterilní vodný roztok, určený k injektování, obsahuje :

Analog restriktocinu/selektivní protilátku k nádoru	1,0 mg
Octan sodný trihydrát	6,8 mg
Chlorid sodný	7,2 mg
Tween 20	0,05 mg/ml roztoku

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:1:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 38 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:1:

CCCTCAGCTG CAGCTACTTG GACTTGYATC AAYCARCA

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 51 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:2:

CACCGACGTC GACTATTATT ARTGRSWRCA CAGNCGCAGR TCRCCYTGRT T

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 41 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:3:

AATTCGAGCT CGCCCGGGGA TCCTGCAGCT ACTTGGACTT G

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:4:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 45 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:4:

CCAAGCTTGG GTTGCAGGTC GACTATTATT AGTGGCTACA CAGTC

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:5:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKvence :

- (A) DÉLKA : 17 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKvence : SEQ ID NO:5:

GTTTTCCCAG TCACGAC

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:6:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKvence :

- (A) DÉLKA : 17 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKvence : SEQ ID NO:6:

CAGGAAACAG CTATGAC

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:7:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKvence :

- (A) DÉLKA : 17 bází

- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:7:

ACGGGAATGG CAAGCTC

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:8:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 17 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:8:

GGTCTGGCTG TGCTTCG

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:9:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 17 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:9:

GAACCAGTGC GGGTAGC

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:10:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 456 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:10:

GCT ACT TGG ACT TGT ATC AAC CAA CAG CTG AAT CCC AAG ACA 42
Ala Thr Trp Thr Cys Ile Asn Gln Gln Leu Asn Pro Lys Thr
1 5 10

AAC AAA TGG GAA GAC AAG CGG CTT CTA TAC AGT CAA GCC AAA 84
Asn Lys Trp Glu Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Ser Gln Ala Lys
15 20 25

GCC GAA AGC AAC TCC CAC CAC GCA CCT CTT TCC GAC GGC AAG 126
Ala Glu Ser Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys
30 35 40

ACC GGT AGC AGC TAC CCG CAC TGG TTC ACT AAC GGC TAC GAC 168
Thr Gly Ser Ser Tyr Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp
45 50 55

GGG AAT GGC AAG CTC ATC AAG GGT CGC ACG CCC ATC AAA TTC 210
Gly Asn Gly Lys Leu Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe

60	65	70	
GGA AAA GCC GAC TGT GAC CGT CCC CCG AAG CAC AGC CAG AAC			252
Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg Pro Pro Lys His Ser Gln Asn			
75	80		
GGC ATG GGC AAG GAT GAC CAC TAC CTG CTG GAG TTC CCG ACT			294
Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu Leu Glu Phe Pro Thr			
85	90	95	
TTT CCA GAT GGC CAC GAC TAT AAG TTT GAC TCG AAG AAA CCC			336
Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys Pro			
100	105	110	
AAG GAA GAC CCG GGC CCA GCG AGG GTC ATC TAT ACT TAT CCC			378
Lys Glu Asp Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro			
115	120	125	
AAC AAG GTG TTT TGC GGC ATT GTG GCC CAT CAG CGG GGG AAT			422
Asn Lys Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn			
130	135	140	
CAA GGC GAT CTG CGA CTG TGT AGC CAC TAA TAA TAG			456
Gln Gly Asp Leu Arg Leu Cys Ser His			
145			

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:11:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE:

(A) DÉLKA : 51 báží

- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:11:

CAATCTAGAG GGTATTAATA ATGTTCCCAT TGGAGGATGA TTAAATGGTA C

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:12:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 51 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:12:

CATTTAATCA TCCTCCAATG GGAACATTAT TAATACCCTC TAGATTGAGC T

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:13:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 21 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:13:

CCGAAGCACT GCCAGAACGG C

(3) ÚDAJE O SEQ ID NO: 14

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 21 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:14:

CACGACTATT GCTTTGACTC G

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:15:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 21 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:15:

CTGAATCCCT GCACAAACAA A

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:16:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 30 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:16:

CTGTGTAGCC ACTGCGGTTA ATAATAGTCG

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:26:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE:

- (A) DÉLKA :24 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:26:

GCAGTTACTT GGACTTGCCT GAAC

24

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:27:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 63 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:27:

GTTTCGTATT TGTTAGTTTT CGGGTTTTTC TGGTCGTTCA GGCAAGTCCA 50

AGTAACTGCT GCA 63

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:31:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 30 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknové

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:31:

GTCCGCCGAA AACTGCAAA GACGGTAACG 30

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:34:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 30 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:34:

GGTCACGACT ACTGTTTCGA CTCTAAAAAA 30

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO :35:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE .

- (A) DÉLKA : 30 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:35:

ACCAGAAAAA CCCGTGTACT AACAAATACG

30

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:36:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE .

- (A) DÉLKA : 30 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:36:

CTGTGCTCTC ACTGCGGTTG ATGGATCCCC

30

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:37:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 50 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:37:

GTAAACTGG TTCCTCTTAC CCGCACTGGT TCACTAACGG TTACGACGGT

50

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:38:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 50 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) PPOPISEKVENCE : SEQ ID NO: 38:

AGTGAACCAG TGCGGGTAAG AGGAACCAGT TTTACCGTCA GACAGCGGAG

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:39:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 55 bází

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:39:

GATCCGTCGA CTCAGTGAGA GCACAGTTTC AGTTCACCCT GGTTTTCTTT AGTGT

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:40:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 36 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) PPOPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:40:

AGGGTGAAC T GAAACTGTGCN TCTCACTGAG TCGACG

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:41:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 21 bází
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZEC : jednovláknový
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEQ ID NO:41:

TTTGACTCGT GCAAACCCAA G

(2) ÚDAJE O SEQ ID NO:42:

(i) CHARAKTERISTIKY SEKvence :

(A) DÉLKA : 30 bází

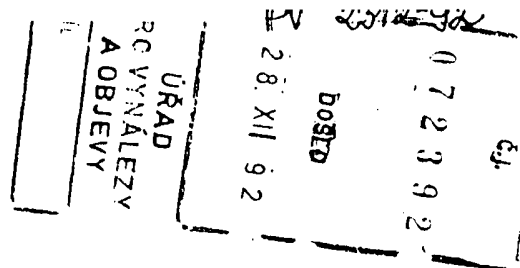
(B) TYP : nukleová kyselina

(C) ŘETĚZEC : jednovláknový

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKvence : SEQ ID NO : 42:

ACAAATTCGA CTCTTGTAAG CCGAAAGAAA



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bílkovinný analog přírodního ribotoxinu, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že jak bílkovinný analog tak
přírodní ribotoxin mohou štěpit pouze jednoduchou fosfodies-
terovou vazbu 28S rRNA v 60S ribosomální podjednotce, a že
bílkovinný analog obsahuje pouze jeden cystein vhodný pro ko-
valentní vazbu na jinou látku, přičemž uvedený cystein není
přítomen v přírodním ribotoxinu.

2. Bílkovinný analog podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že přírodním ribotoxinem je res-
triktocin, mitogillin nebo alfa-sarcin.

3. Bílkovinný analog podle nároku 2, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že

(a) analogy restriktocinu jsou:

i) analogy restriktocinu, v nichž je namísto libovolného
z následujících zbytků přítomných v přírodním restriktocinu
obsažen cystein: Lys 13, Lys 20, Lys 28, Lys 60, Lys 63,
Lys 69, Ser 82, Lys 88, Lys 106, Lys 110 a Lys 128,

(ii) přírodní restriktocin prodloužený na C-konci o Cys 150-
-Gly 151 a

(iii) přírodní restriktocin prodloužený na N-konci o Gly-Cys
restriktocin,

(b) analogy mitogillinu jsou:

(i) analogy mitogillinu, v nichž je namísto libovolného z ná-
sledujících zbytků přítomných v přírodním mitogillinu obsažen
cystein: Lys 13, Lys 20, Lys 28, Lys 60, Lys 63, Lys 69,
Ser 82, Lys 88, Lys 106, Lys 110 a Lys 128,

(ii) přírodní mitogillin prodloužený na C-konci o Cys 150 -
- Gly 151 a

(iii) přírodní mitogillin prodloužený na N-konci o Gly-Cys mitogillin, a

(c) analogy alfa-sarcinu jsou:

(i) analogy alfa-sarcinu, v nichž je namísto libovolného z následujících zbytků přítomných v přírodním alfa-sarcinu obsažen cystein: Lys 14, Lys 21, Lys 29, Lys 61, Lys 64, Lys 70, Ser 83, Lys 89, Lys 107, Lys 111 a Lys 129,

(ii) přírodní alfa-sarcin prodloužený na C-konci o Cys 151 - Gly 152 a

(iii) přírodní alfa-sarcin prodloužený na N-konci o Gly-Cys alfa-sarcin.

4. Bílkovinný analog podle nároku 3, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že

(a) analogy restriktocinu jsou:

(i) analogy restriktocinu, v nichž je namísto libovolného z následujících zbytků přítomných v přírodním restriktocinu obsažen cystein: Lys 13, Ser 82, Lys 106 a Lys 110, a

(ii) přírodní restriktocin prodloužený na C-konci o Cys 150 - Gly 151,

(b) analogy mitogillinu jsou:

(i) analogy mitogillinu, v nichž je namísto libovolného z následujících zbytků obsažených v přírodním mitogillinu obsažen cystein: Lys 13, Ser 82, Lys 106 a Lys 110, a

(ii) přírodní mitogillin prodloužený na C-konci o Cys 150 - Gly 151, a

(c) analogy alfa-sarcinu jsou:

(i) analogy alfa-sarcinu, v nichž je namísto libovolného z následujících zbytků přítomných v přírodním alfa-sarcinu obsažen cystein: Lys 14, Ser 83, Lys 107 a Lys 111, a

(ii) přírodní alfa-sarcin prodloužený na C-konci o Cys 151 - Gly 152.

5. Konjugát, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje partnerskou látku vázanou kovalentní vazbou na bílovinný analog definovaný v nárocích 1 až 4.

6. Konjugát podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že partnerskou látkou je činidlo schopné selektivně se vázat k nádorům.

7. Polynukleotidová sekvence, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je schopna kódovat bílkovinný analog definovaný v nárocích 1 až 4.

8. Replikativní klonovací vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje polynukleotidovou sekvenci definovanou v nároku 7.

9. Replikativní expresní vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje polynukleotidovou sekvenci definovanou v nároku 7.

10. Rekombinantní hostitelské buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou transformovány replikativním expresním vektorem definovaným v nároku 9.

11. Způsob výroby bílkovinných analogů podle nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivují rekombinantní hostitelské buňky definované v nároku 10.

12. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jako účinnou složku konjugát definovaný v nároku 6, v kombinaci s farmaceutickým nosičem nebo/a pomocnou látkou.

13. Konjugát definovaný v nároku 6, pro použití k léčbě nádorových onemocnění v humánní a veterinární medicíně.